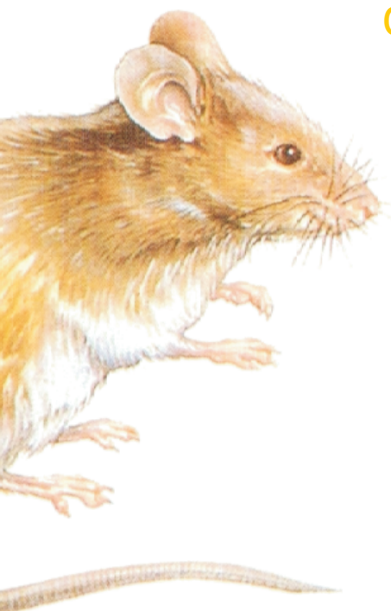
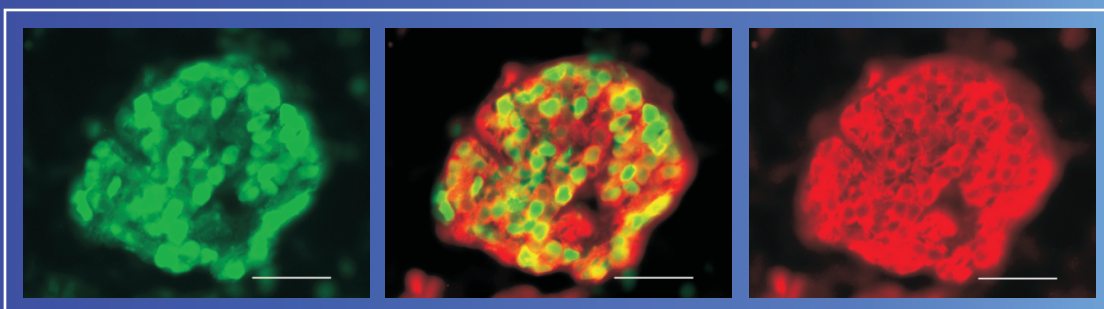


Immunhistochemische und funktionelle Charakterisierung von Neuronen des parasymphatischen *Ganglion sphenopalatinum* der transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

SANDRA NOBEL



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 3-89687-678-3

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

***Immunhistochemische und funktionelle
Charakterisierung von Neuronen des
parasymphischen Ganglion sphenopalatinum der
transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL***

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
Sandra Nobel
Tierärztin aus Münster**

Gießen 2004

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Professor Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

PD Dr. Sybille Mazurek

Tag der Disputation: 24.06.2004

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN.....	8
KAPITEL 1: EINLEITUNG.....	11
1.1 OLFAKTION UND OLFAKTORISCHE REZEPTOREN	11
1.1.1 G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN	14
1.1.2 DER MOL2.3-REZEPTOR	15
1.2 DIE TRANSGENE MAUSLINIE MOL2.3-IGITL.....	20
1.3 DAS <i>GANGLION SPHENOPALATINUM</i>	22
1.3.1 ANATOMIE DES GANGLION SPHENOPALATINUM.....	22
1.3.2 PHYSIOLOGIE DES GANGLION SPHENOPALATINUM.....	28
1.4 TRANSMITTERSYSTEME IN VEGETATIVEN GANGLIEN	28
1.4.1 DAS CHOLINERGE SYSTEM	29
1.4.2 DAS NITRERGE SYSTEM.....	32
1.4.3 DAS PACAPERGE SYSTEM	34
1.5 Ca^{2+} ALS INTRAZELLULÄRER BOTENSTOFF	35
1.6 ZIELE DER ARBEIT	37
KAPITEL 2: MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 MATERIAL.....	39
2.1.1 GERÄTE.....	39
2.1.2 GEBRAUCHSMATERIAL.....	40
2.1.3 VERBRAUCHSMATERIAL	40
2.1.4 CHEMIKALIEN	41
2.2 VERSUCHSTIERE	43
2.2.1 MOL2.3-IGITL MÄUSE	43
2.2.2 WISTAR RATTEN	44
2.3 VERWENDETE ELEKTROLYTLÖSUNGEN UND PUFFER.....	44
2.3.1 LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE	44
2.3.1.1 Phosphatpuffer (PB).....	44
2.3.1.2 Präinkubationspuffer	45
2.3.1.3 Inkubationspuffer	45
2.3.1.4 Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)	45
2.3.1.5 Saccharoselösung (20 %)	46
2.3.2 LÖSUNGEN FÜR DIE PRIMÄRKULTUR.....	46
2.3.3 LÖSUNGEN FÜR DIE Ca^{2+} -IMAGING MESSUNGEN	46

2.3.3.1	Messpuffer	46
2.3.3.2	High-Kalium Puffer	46
2.3.3.3	Calcium-Minimalpuffer	47
2.4	METHODEN	48
2.4.1	IMMUNHISTOCHEMIE.....	48
2.4.1.1	Grundlagen der Immunhistochemie.....	48
2.4.1.2	Neurotransmitter-Coding mittels Immunhistochemie	51
2.4.1.3	Verwendete Antikörper	52
2.4.1.3.1	Die Primärantikörper.....	52
2.4.1.3.1.1	Die anti-GFP Antikörper.....	53
2.4.1.3.1.2	Der anti-NSE Antikörper	53
2.4.1.3.1.3	Der anti-PGP9.5 Antikörper	53
2.4.1.3.1.4	Der anti-ChAT Antikörper.....	54
2.4.1.3.1.5	Der anti-VACht Antikörper	54
2.4.1.3.1.6	Der anti-nNOS Antikörper.....	54
2.4.1.3.1.7	Der anti-PACAP Antikörper	55
2.4.1.3.1.8	Der anti-SP Antikörper	55
2.4.1.3.2	Die Sekundärantikörper	55
2.4.1.3.3	Kombinationen der Primär- und Sekundärantikörper	56
2.4.1.4	Versuchsdurchführung.....	56
2.4.1.4.1	Herstellung der Präparate für die immunhistochemischen Untersuchungen des Ganglion sphenopalatinum	56
2.4.1.4.2	Immunhistochemisches Protokoll	58
2.4.1.5	Negativkontrollen.....	58
2.4.1.5.1	Nachweis der Spezifität der Primärantikörper	58
2.4.1.5.1.1	Präparation der Gewebe	59
2.4.1.5.1.2	Immunhistochemisches Protokoll.....	59
2.4.1.5.2	Nachweis der Spezifität der Sekundärantikörper.....	59
2.4.1.6	Auswertung	60
2.4.2	PRIMÄRE ZELLKULTUR DES GANGLION SPHENOPALATINUM DER TRANSGENEN MOL2.3-IGITL MAUS	61
2.4.2.1	Grundlagen der Zellkultur.....	61
2.4.2.2	Montage und Beschichtung der Zellkulturkammern.....	62
2.4.2.3	Präparation des Ganglion sphenopalatinum.....	62
2.4.2.4	Weiterverarbeitung des Gewebes.....	63
2.4.3	MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION MITTELS RATIO- IMAGING TECHNIK	64
2.4.3.1	Grundlagen der Ratio-Imaging Technik	64
2.4.3.2	Der Einsatz von Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester in der Primärkultur	67

2.4.3.3	Der Imaging-Messstand	68
2.4.3.4	Messprotokolle	69
2.4.3.4.1	Kalium	71
2.4.3.4.2	Acetylcholin	72
2.4.3.4.2.1	Dosisabhängigkeit und Wiederholbarkeit	72
2.4.3.4.2.2	Herkunft des Calciums nach Stimulation mit Acetylcholin	73
2.4.3.4.2.3	Agonisten	73
2.4.3.4.2.4	Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor Blocker	74
2.4.3.4.3	Calcium-Kanal Blocker	75
2.4.3.4.4	Stickstoffmonoxid	76
2.4.3.4.4.1	NO-Donoren	77
2.4.3.4.4.2	Vinyl-L-NIO	78
2.4.3.4.5	PACAP	79
2.4.3.4.6	Noradrenalin	79
2.4.3.4.7	Glutamat	80
2.4.3.5	Auswertung	81
KAPITEL 3: ERGEBNISSE		83
3.1	IMMUNHISTOCHEMIE	83
3.1.1	KONTROLLEN	83
3.1.2	MORPHOLOGIE DES GANGLION SPHENOPALATINUM	85
3.1.3	GFP UND NSE	86
3.1.4	GFP UND CHAT	88
3.1.5	GFP UND VACHT	89
3.1.6	GFP UND nNOS	91
3.1.7	VACHT UND nNOS	92
3.1.8	GFP UND PACAP	93
3.1.9	GFP UND SP	94
3.2	ZELLKULTUR	95
3.3	CALCIUM-IMAGING	96
3.3.1	KALIUM	96
3.3.2	ACETYLCHOLIN	98
3.3.2.1	Stimulation mit Acetylcholin	98
3.3.2.2	Dosisabhängigkeit	101
3.3.2.3	Wiederholbarkeit	105
3.3.2.4	Herkunft des Calciums nach Stimulation mit Acetylcholin	108
3.3.2.5	Nicotinerger/muscarinerger Acetylcholin-Rezeptor Subtyp	112
3.3.2.6	Nicotinerge Rezeptorsubtypisierung	115

3.3.2.6.1 Homomere $\alpha 7$ nAChR und MLA.....	115
3.3.2.6.2 Heteromere $\alpha 3\beta 4$ nAChR und ω -Conotoxin MVIIC.....	120
3.3.3 SPANNUNGSABHÄNGIGE CALCIUM-KANÄLE UND ω -CONOTOXINE BZW. NIFEDIPIN.....	123
3.3.3.1 N-Typ Calcium-Kanäle und ω -Conotoxine	124
3.3.3.2 L-Typ Calcium-Kanäle und Nifedipin	127
3.3.4 STICKSTOFFMONOXID (NO)	131
3.3.4.1 Synthetische NO-Donorsubstanzen: DEA	132
3.3.4.2 Synthetische NO-Donorsubstanzen: Nor-1	138
3.3.4.3 Vinyl-L-NIO	142
3.3.5 PACAP.....	146
3.3.6 NORADRENALIN	152
3.3.7 GLUTAMAT	153
3.4. ÜBERSICHT ÜBER DIE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN MOL2.3-POSITIVEN UND – NEGATIVEN ZELLEN	155
KAPITEL 4: DISKUSSION.....	157
4.1 DAS CHOLINERGE SYSTEM.....	157
4.2 DAS NITRERGE SYSTEM UND DESSEN INTERAKTION MIT DEM CHOLINERGEN SYSTEM	161
4.3 DAS PACAPERGE SYSTEM UND DESSEN INTERAKTION MIT DEM CHOLINERGEN SYSTEM	169
4.4 SUBSTANZ P	172
4.5 NORADRENALIN UND GLUTAMAT	172
4.6 SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK	173
ZUSAMMENFASSUNG	174
SUMMARY	177
LITERATURVERZEICHNIS	179
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	203
DANKSAGUNG.....	208
ERKLÄRUNG.....	209

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat
AP	<i>Area postrema</i>
ARW	Anregungswellenlänge
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _{ez}	extrazelluläre Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _{iz}	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches (engl.: <i>cyclic</i>) Adenosin-3',5'-monophosphat
CCG	<i>Ganglion cervicale craniale</i>
cDNA	<i>copy</i> DNA
cGMP	zyklisches (engl.: <i>cyclic</i>) Guanosin-3',5'-monophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
Con A	Concanavalin A
Cy3	Carboxymethylindocyanin 3
DAG	Diacylglycerin
DEA	2-(N,N-Diethylamino)-diazolat-2-oxid
d.h.	das heißt
DMPP	Dimethylphenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
E (z.B. E11)	Embryonalstadium (z.B. embryonaler Tag 11)
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethyläther)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EWL	Emissionswellenlänge
F _{ab}	Antigen-bindendes Fragment (engl.: <i>fragment antigen binding</i>)
F _c	kristallisierendes Fragment (engl.: <i>fragment crystallizable</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
g	Gramm

Abkürzungen

GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
Ggl.	Ganglion
GluR	Glutamatrezeptor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyäthyl)-piperazin-N'-(2-äthansulfonsäure)
IgG	Immunglobulin G
IGITL	IRES-GFP-IRES- <i>tau-lacZ</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
Kap.	Kapitel
l	Liter
M	Mol
mAChR	muscarinerger Acetylcholin-Rezeptor
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLA	Methyllycaconitin
mM	Millimol pro Liter
MOL	<i>mouse olfactory like</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	arithmetischer Mittelwert
N., Nn.	<i>Nervus, Nervi</i> (plural)
Na ⁺	Natrium
NA	Noradrenalin
nAChR	nicotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
Ncl., Ncll.	<i>Nucleus, Nuclei</i> (plural)
NHS	<i>normal horse serum</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
Nor-1	(±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid

Abkürzungen

NSE	Neuronen-spezifische Enolase (engl.: <i>neuron specific enolase</i>)
NTS	<i>Nucleus tractus solitarii</i>
ω -Ctx	ω -Conotoxin
OR	olfaktorischer Rezeptor (engl.: <i>odorant receptor</i>)
OSN	olfaktorisches sensorisches Neuron
PAC1	PACAP Typ 1
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
PB	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PGP9.5	Protein Gen-Produkt 9.5 (engl.: <i>protein gene product</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Protein-Kinase A
PLC	Phospholipase C _{γ}
PN (z.B. PN20)	postnatal (z.B. postnataler Tag 20)
RA1c	<i>rat Class I OR gene</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: <i>standard error of the mean</i>)
SIF	<i>small intensiv fluorescent</i>
SP	Substanz P
SPG	<i>Ganglion sphenopalatinum</i>
syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
UV	Ultraviolett
VACht	vesikulärer Acetylcholin-Transporter
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VNS	vegetatives (autonomes) Nervensystem
VPAC	VIP-Typ PACAP-Rezeptor
x-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

Kapitel 1: Einleitung

1.1 Olfaktion und olfaktorische Rezeptoren

Obwohl der Geruchssinn für das Überleben vieler Wirbeltiere eine große biologische Bedeutung hat, ist er bis heute doch der am wenigsten verstandene Sinn (Breer et al. 1996). Der Geruchssinn dient der Kommunikation, Orientierung, Warnung und der Beeinflussung von Stimmungen, Emotionen und Affekten (Hatt 2003). So kann z.B. die Nahrungssuche oder das Finden des Geschlechtspartners überwiegend aufgrund des Geruchs erfolgen. Auch die Markierung der Reviere mit Duftstoffen spielt in der Tierwelt eine große Rolle (Hatt 2003, Penzlin 1996). Außerdem leitet der Geruchssinn die Verdauung ein, da der Geruch von Nahrungs- bzw. Futtermitteln eine der auslösenden Komponenten der cephalischen Phase der Speichel-, Magen- und Darmsekretion ist (Wittke 1987).

Während der Mensch mit lediglich 2×10^7 Sinneszellen im Bereich der gesamten Riechschleimhaut ebenso wie alle Primaten zu den Mikrosmaten, d.h. zu den Tieren mit geringem Geruchsvermögen, zählt, gelten Insektivoren, Nage-, Huf- und Raubtiere als Makrosmaten. So besitzt das Kaninchen beispielsweise 10^8 Riechsinneszellen, der Hund sogar $2,3 \times 10^8$ (Penzlin 1996). Um von landlebenden Wirbeltieren olfaktorisch wahrgenommen werden zu können, muss eine Substanz flüchtig, fettlöslich und mindestens zweiatomig sein. Jedoch sind nicht alle Substanzen, die diese Bedingungen erfüllen, für Wirbeltiere riechbar. Aquatische Tiere dagegen registrieren wasserlösliche Duftstoffe, wie beispielsweise Aminosäuren und Nukleotide (Mombaerts 2001). Die Zahl der riechbaren Substanzen ist unbekannt (Penzlin 1996).

Volatile Substanzen werden über spezialisierte, olfaktorisch-sensorische Neurone (OSN) im Riechepithel der Nase wahrgenommen. Diese OSNs stellen primäre, bipolare Sinneszellen dar (Hatt 1995), und sind bei den Säugetieren nur im dorsalen Bereich der Nasenhöhle lokalisiert (Penzlin 1996, Wittke 1987). Diese Zellen detektieren Geruchsmoleküle durch spezifische G-Protein gekoppelte Riechrezeptoren (Breer 2001, Buck and Axel 1991, Lancet 1986, Mombaerts 2001, Reed 1990, Touhara 2002), welche an der Oberfläche modifizierter Zilien sitzen. Versuche, die Familie dieser olfaktorischen Rezeptoren (OR) strukturell-funktionell oder evolutionsgeschichtlich zu klassifizieren, führten dazu, dass sie in zwei Gruppen unterteilt wurde: Klasse I Riechrezeptoren (auch *fish-like* OR genannt) und Klasse II Riechrezeptoren (*mammalian-like* OR) (Breer 2001, Freitag et al. 1995, Hatt 1995, 2003, Mezler et al. 2001, Mombaerts 2001, Ngai et al. 1993). Es wurde postuliert, dass Klasse I Riechrezeptoren wasserlösliche Moleküle detektieren, Klasse II Rezeptoren dagegen volatile Substanzen (Breer 2001, Mombaerts 2001).

Die Zilien der OSNs ragen in eine Schleimschicht, welche die Oberfläche der Nasenschleimhaut bedeckt. Bei terrestrisch lebenden Tieren müssen die lipophilen Duftmoleküle in diesem wässrigen Medium gelöst werden, um zu den Riechrezeptoren diffundieren und an diese binden zu können (Randall et al. 2002, Wittke 1987). Dies wird durch kleine, wasserlösliche odorantbindende Proteine gewährleistet (Breer 2001). Vermutlich gibt es hunderte verschiedener Riechrezeptoren, die alle zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören. Jeder einzelne Riechrezeptor wird von einem eigenen Gen codiert (Alberts and Johnson 2001, Hatt 2003), so dass die Gene für die olfaktorischen Rezeptoren etwa 1 % aller Gene beim Säuger repräsentieren und somit die größte Genfamilie des Säuger-Genoms bilden (Mombaerts 1999, 2001, Randall et al. 2002, Touhara 2002). OR, die sensitiv sind für spezifische Duftmoleküle, werden nur in ganz bestimmten Regionen des Epithels exprimiert (den sogenannten Expressionszonen), und zwar symmetrisch für beide Nasenhälften (Hatt 2003, Mombaerts 2001, Schmidt and Zimmermann 1987, Strotmann et al. 1995).

Bei den meisten Riechrezeptoren wird nach Bindung des adäquaten Liganden eine Signalkaskade ausgelöst, in deren Verlauf die Konzentration des 2nd messengers cAMP verändert wird (Breer 2001). Werden die Rezeptoren durch Bindung von Geruchsmolekülen stimuliert, so aktivieren sie ein geruchsspezifisches, trimeres G-Protein (G_{olf}) (Lancet et al. 1993, Mombaerts 2001, Zufall et al. 1994). Dieses wiederum aktiviert die Adenylatzyklase, welche die Bildung von cAMP katalysiert. Im weiteren Verlauf der Kaskade werden cAMP-gesteuerte Kationenkanäle in der Membran der Zilien geöffnet (Broillet and Firestein 1996b, 1999, Hatt 2003), durch welche es zum Einstrom ein- und zweiwertiger Kationen (Na^+ und Ca^{2+}) in die Zelle kommt. Die Zelle wird depolarisiert und ein Nervenimpuls gelangt über das Axon in den *Bulbus olfactorius* des Gehirns (Alberts and Johnson 2001, Hatt 2003, Mombaerts 2001, Randall et al. 2002, Schmidt and Zimmermann 1987). Vermutlich kann die Öffnung eines einzigen oder sehr weniger Kanäle schon ein Aktionspotential auslösen (Penzlin 1996).

Andere Riechrezeptoren benutzen zusätzlich den Inositol-Phospholipid-Signalweg. Die Bindung eines Liganden an einen solchen Rezeptor erhöht neben der cAMP-Konzentration auch die von IP_3 (Breer 1993, Breer and Shepherd 1993, Hatt 2003). In der Folge werden IP_3 -gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran geöffnet. Über den weiteren, intrazellulären Transduktionsmechanismus ist bisher nur wenig bekannt (Schmidt and Zimmermann 1987, Zufall and Munger 2001).

Jede Riechzelle spricht auf spezifische Geruchsmoleküle an. Es ist allerdings noch unklar, ob jedes olfaktorische Neuron über einen einzigen Rezeptortyp verfügt (Mombaerts 2001), der die Gesamtheit dieser Geruchsmoleküle erkennt, oder aber

über verschiedene Rezeptoren, von denen jeder nur ein spezifisches Geruchsmolekül detektiert (Alberts and Johnson 2001, Mombaerts 2001).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Gene für olfaktorische Rezeptoren nicht ausschließlich im olfaktorischen Epithel exprimiert werden, sondern zusätzlich in anderen Geweben (Vanti et al. 2003). So wurde mittels PCR (*polymerase chain reaction*) und *in situ* Hybridisierung der Riechrezeptor OL1 im sich entwickelnden Herz der Ratte nachgewiesen, während der Nachweis des olfaktorischen Rezeptorproteins OL2 in der Milz der Ratte und in einer Insulin-sezernierenden Zelllinie der Maus (MIN6) gelang (Blache et al. 1998, Drutel et al. 1995). Auch der potentielle Riechrezeptor RA1c wird neben dem Riechepithel zusätzlich in distinkten Hirnarealen exprimiert (Conzelmann et al. 2000, Raming et al. 1998). Weber et al. (2002) konnten schließlich zeigen, dass der olfaktorische Rezeptor MOL2.3 im Riechepithel, der *Area postrema* (AP) und dem *Nucleus tractus solitarius* (NTS) des Hirnstamms sowie in verschiedenen autonomen Ganglien der Maus exprimiert wird (Kapitel 1.1.2). Aus dem Hoden des Menschen konnten sogar über 50 verschiedene OR kloniert werden (Mombaerts 2001). Weitere OR konnten im Notochord des Huhnes (Nef and Nef 1997) sowie in erythroiden Zellen von Mensch und Maus nachgewiesen werden (Feingold et al. 1999, Mombaerts 2001). Scheinbar hat die Tatsache, dass die Familie der olfaktorischen Rezeptoren außergewöhnlich viele verschiedene Liganden detektieren kann, dazu geführt, dass OR im Laufe der Evolution spezifische, chemosensorische Aufgaben in nicht-olfaktorischen Zelltypen übernommen haben (Mombaerts 2001).

In jüngster Zeit häufen sich Berichte mit Hypothesen, denen zufolge olfaktorischen Rezeptoren noch weitere Funktionen neben der Chemodetektion von Geruchsmolekülen zukommen sollen. Für den murinen Riechrezeptor OR3 beispielsweise wird aufgrund seines Expressionsmusters beim Embryo eine Rolle bei der Entwicklung des olfaktorischen Systems diskutiert (Nef et al. 1992). Auch Wang et al. (1998) postulieren für OR eine wichtige Funktion in der Embryogenese. Aufgrund kürzlich durchgeführter *receptor-swapping* und *knock-out* Experimente wird einigen olfaktorischen Rezeptorproteinen eine bedeutende Rolle in der Zell-Zell-Erkennung und Zell-Positionierung während der Ontogenese zugesprochen (Mombaerts et al. 1996, Rodriguez et al. 1999, Wang et al. 1998). Eine Hypothese hierzu ist die „*area code*“ Hypothese (Drutel et al. 1995, Hood et al. 1977). Danach wird die spezifische, topologische Positionierung von Zellen und deren Interaktionen mit anderen Zellen des Verbandes durch ein hierarchisch strukturiertes System von Zell-Oberflächenmarkern determiniert. Individuelle Zellen besitzen demnach spezifische molekulare „Adressen“, und können entsprechende „Adressen“ auf anderen Zellen detektieren. Grundvoraussetzung für dieses Konzept ist eine enorme Vielfalt an molekularen Markern, für die eine besonders große Multigenfamilie

postuliert wurde (Hood et al. 1977). Die Entdeckung der Superfamilie olfaktorischer Rezeptoren, die von der bislang größten Genfamilie (mehr als tausend Gene) kodiert werden, hat diese heptahelikalen Rezeptoren in den Blickpunkt des Interesses gerückt (Dreyer 1998).

1.1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Olfaktorische Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, welche die größte Familie unter den Zelloberflächen-Rezeptoren bilden (Christopoulos and Kenakin 2002, Rios et al. 2001). GPCR vermitteln die Zellantwort auf Signalmoleküle, welche sowohl in bezug auf ihre Struktur als auch ihre Funktion sehr unterschiedlich sein können (Alberts and Johnson 2001). Als extrazelluläre Signale kommen z.B. Peptide, Aminosäure-Derivate, aber auch sensorische Stimuli wie Duftstoffe in Frage (Gurrath 2001, Nordheim and Lammers 2003, Rios et al. 2001).

Alle bekannten GPCR weisen eine ähnliche Struktur auf und sind sehr wahrscheinlich miteinander verwandt. Die Rezeptoren bestehen aus einer einzelnen Polypeptid-Kette, welche durch sieben hydrophobe Transmembrandurchgänge und eine Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schlaufe charakterisiert ist (Baldwin 1993, Nordheim and Lammers 2003).

GPCR sind über trimere, GTP-bindende Proteine (G-Proteine) funktionell an ihre Zielenzyme oder -ionenkanäle gekoppelt. Trimere G-Proteine bestehen aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten (α , β und γ). Die α -Untereinheit bindet und hydrolysiert GTP und bindet je nach G-Protein an verschiedene Effektorproteine (Nordheim and Lammers 2003). Die β - und γ -Untereinheit bilden einen Komplex ($\beta\gamma$), welcher das G-Protein in der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran verankert (Alberts and Johnson 2001). In der inaktiven Form liegt das G-Protein als Trimer vor, an dessen α -Untereinheit GDP gebunden ist. Wird der GPCR durch Bindung eines Liganden aktiviert, so tauscht die α -Untereinheit ihr GDP gegen GTP. In Folge dessen bewegt sich die α -Untereinheit durch laterale Diffusion minimal von $\beta\gamma$ weg und bindet stattdessen an ein entsprechendes Enzym.

Die Bindung eines Liganden an einen GPCR löst also eine Kette von Ereignissen aus, welche die Konzentration eines oder mehrerer intrazellulärer Signalmoleküle (2nd messenger) ändert. Als 2nd messenger fungieren in den meisten Zellen cAMP, cGMP, IP₃, DAG oder Ca²⁺ (Alberts and Johnson 2001, Nordheim and Lammers 2003). Diese wiederum ändern das Verhalten bestimmter zellulärer Proteine. In Abhängigkeit vom Rezeptortyp kann dasselbe Signalmolekül die intrazelluläre Konzentration des jeweiligen 2nd messengers erhöhen oder erniedrigen.

Der Unterschied basiert auf der Art des G-Proteins (Forth et al. 2001, Klinke and Silbernagel 2003).

Einige G-Proteine können Ionenkanäle in Plasmamembranen der Zielzellen direkt aktivieren oder inaktivieren, und so die Permeabilität und Erregbarkeit ändern. Andere trimere G-Proteine regulieren die Aktivität von Ionenkanälen weniger direkt. Sie phosphorylieren Kanäle oder bewirken die Synthese oder Spaltung zyklischer Nukleotide, welche wiederum Ionenkanäle aktivieren oder inaktivieren (Alberts and Johnson 2001, Forth et al. 2001). Solche durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle spielen bei der Olfaktion eine bedeutende Rolle (Broillet and Firestein 1996b, 1999, Hatt 2003).

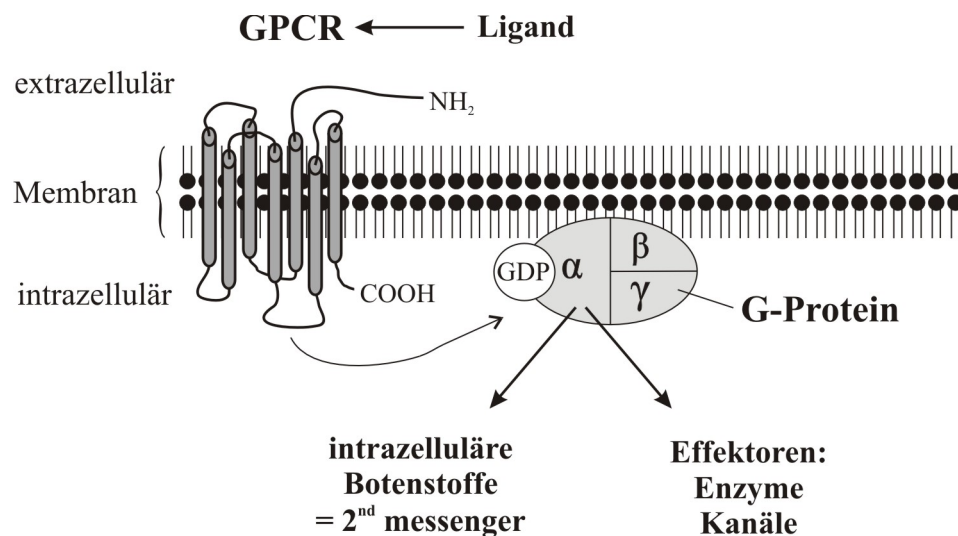


Abbildung 1 : Die Signalkaskade G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR)

Nach extrazellulärer Bindung eines Liganden an den GPCR induziert eine Konformationsänderung des entsprechenden GPCR die Aktivierung eines membranassoziierten G-Proteins. Je nach Art des G-Proteins wird anschließend die Konzentration intrazellulärer 2nd messenger geändert oder es werden (direkt oder indirekt) Ionenkanäle oder Enzyme beeinflusst.

1.1.2 Der MOL2.3-Rezeptor

Durch verschiedene molekularbiologische Ansätze, insbesondere durch die gezielte Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR oder die systematische Sequenzierung von cDNA-Klonen sind in jüngster Zeit eine Reihe neuer G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) identifiziert worden (Berthold et al. 2003, Simon and Barnard 2003, Vanti et al. 2003). Die funktionelle Bedeutung sowie endogene Liganden dieser Rezeptoren sind bislang unbekannt; sie werden dementsprechend als

Orphan-Rezeptoren (*orphan*, engl.: Waise) bezeichnet (Howard et al. 2001, Marchese et al. 1999, Saito et al. 1999, Vassilatis et al. 2003, Wise et al. 2004).

Im Rahmen solcher Ansätze konnte ein cDNA Klon aus einer Genbank des Rattengehirns isoliert werden, welcher für einen neuen, putativen GPCR codiert (RA1c; *rat Class I OR gene*) (Raming et al. 1998). Vergleiche der Aminosäuresequenz des RA1c-Rezeptors mit der Sequenz anderer Rezeptoren zeigten eine geringe, aber signifikante Homologie (24-30 %) zu weiteren GPCR (v.a. Peptidhormon-Rezeptoren und Rezeptoren für Adenosin und Melatonin). Eine ähnliche Sequenz-Identität wurde zu olfaktorischen Rezeptoren (OR) gefunden. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass der RA1c-Rezeptor im olfaktorischen Epithel der posterioren Nasenhöhle exprimiert wird. Weitere Hybridisierungssignale konnten in eng umschriebenen Bezirken des vierten Gehirnventrikels und im frontalen Cortex nachgewiesen werden (Conzelmann et al. 2000).

Auf der Suche nach RA1c verwandten Genen der Maus wurde ein orthologes Gen entdeckt: Das MOL2.3-Gen. Dieses Gen weist eine Sequenz-Identität von etwa 30 % mit Genen olfaktorischer Rezeptoren von Säugern und Fischen auf (Freitag et al. 1995). Eine weiterführende phylogenetische Analyse ergab, dass das MOL2.3-Rezeptorprotein näher mit Klasse I Riechrezeptoren verwandt ist als mit den Klasse II Riechrezeptoren der Säuger (Abbildung 2) (Kapitel 1.1). Weiterhin besitzt der MOL2.3-Rezeptor einen vergrößerten, dritten extrazellulären Loop, wie es für Klasse I OR charakteristisch ist. Die genaue funktionelle Bedeutung dieses Loops ist zwar noch unbekannt, jedoch konnte für verschiedene GPCRs gezeigt werden, dass ihm eine wichtige Rolle bei der Ligandenerkennung zukommt (Li et al. 1996, Minami et al. 1995, Strader et al. 1994). *In situ* Hybridisierungsstudien zeigten, dass der MOL2.3-Rezeptor, wie auch der RA1c-Rezeptor, in der *Area postrema* (AP) (Abbildung 3a) und im *Nucleus tractus solitarii* (NTS) der *Medulla oblongata* exprimiert wird. Auch in der dorsalen Zone des olfaktorischen Epithels konnte die Expression des MOL2.3-Rezeptors nachgewiesen werden (Abbildung 3b) (Conzelmann et al. 2000).

Im Laufe der Embryonalentwicklung wird der MOL2.3-Rezeptor der Maus erstmals an den Tagen E11/E12 exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten Hybridisierungssignale vor allem in der dorsalen Region der sich entwickelnden Nasenhöhle sowie im Mesenchym zwischen olfaktorischem Epithel und *Bulbus olfactorius* gefunden werden (\approx 200 Zellen). In der *Medulla oblongata* zeigte sich erst am Tag E17 die Expression des MOL2.3-Rezeptors (ca. 80 Zellen im Gehirn; zur selben Zeit 2.000 Zellen im olfaktorischen Epithel). Während der anschließenden prä- und postnatalen Periode kommt es zu einem fast exponentiellen Anstieg der Zahl *in situ* positiver Zellen. Am 20. Tag *post natum* (PN20) konnten im

olfaktorischen Epithel bereits 30.000 MOL2.3-reaktive Zellen nachgewiesen werden. Zum selben Zeitpunkt wurde in der *Area postrema* und im *Nucleus tractus solitarius* ein Maximum von etwa 1.200 Zellen mit eindeutigem Signal gefunden. Nach dem Tag PN20 kommt es zu einem langsamen Abfall der Zahl MOL2.3-positiver Zellen im NTS (≈ 750 Zellen bei Tieren nach dem Tag PN42) (Conzelmann et al. 2000).

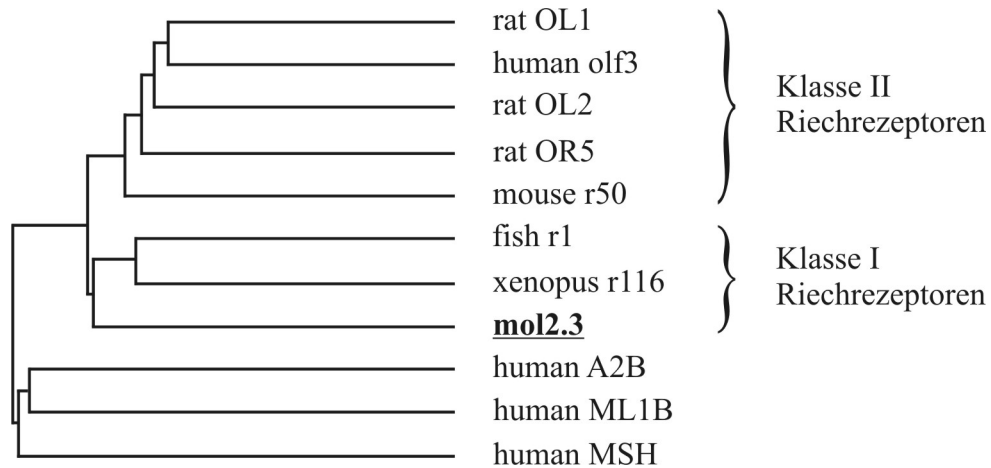


Abbildung 2 : Verwandtschaftsdiagramm des MOL2.3-Rezeptors

Der Stammbaum zeigt, dass der MOL2.3-Rezeptor näher mit den Klasse I Riechrezeptoren der Fische verwandt ist als mit den Klasse II OR. Auch die Homologie zu anderen GPCR (human A2B, human ML1B, human MSH) ist groß.

Bei den Zellen des Nasenepithels, welche den MOL2.3-Rezeptor exprimieren, handelt es sich um olfaktorische, sensorische Neurone (OSN). Es ist allerdings unklar, in welchem Segment der OSN der MOL2.3-Rezeptor lokalisiert ist. Die Axone der MOL2.3-positiven Riechneurone projizieren von der Nasenhöhle durch die *Lamina cribrosa* in den *Bulbus olfactorius*. Sie ziehen zunächst über die Oberfläche des Bulbus, um dann an definierten Stellen zu konvergieren (Abbildung 3c). Die MOL2.3-positiven Axone enden schließlich in individuellen Glomerula des *Bulbus olfactorius* (Conzelmann et al. 2000).

Weber et al. (2002) konnten nachweisen, dass das MOL2.3-Rezeptorprotein darüber hinaus in Subpopulationen zweier autonomer Kopfganglien, des *Ganglion sphenopalatinum* (SPG) sowie des *Ganglion cervicale craniale* (CCG), exprimiert wird (Abbildung 4).

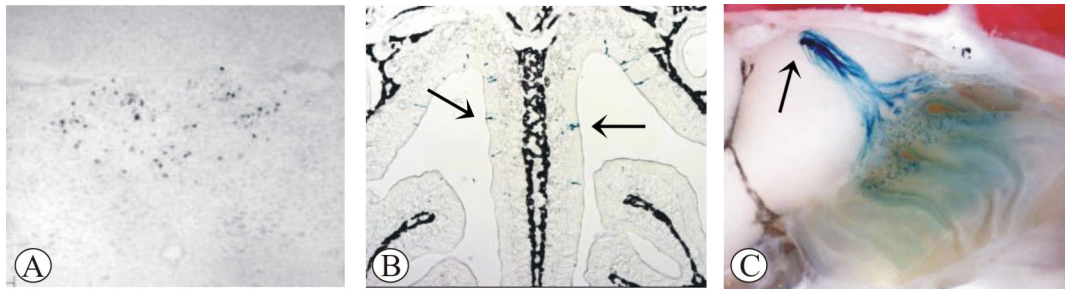


Abbildung 3 : MOL2.3-positive Signale in der *Area postrema* des Hirnstamms und im olfaktorischen Epithel

Auf dem linken Bild sind *in situ* Hybridisierungssignale zu sehen, welche die Expression des MOL2.3-Rezeptors in der *Area postrema* belegen (A).

Mittels X-Gal-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Axone der MOL2.3-positiven OSN (B, Pfeil) zum *Bulbus olfactorius* projizieren, um dort an einzelnen Glomerula (Pfeil) zu konvergieren (C) (Conzelmann et al. 2000).

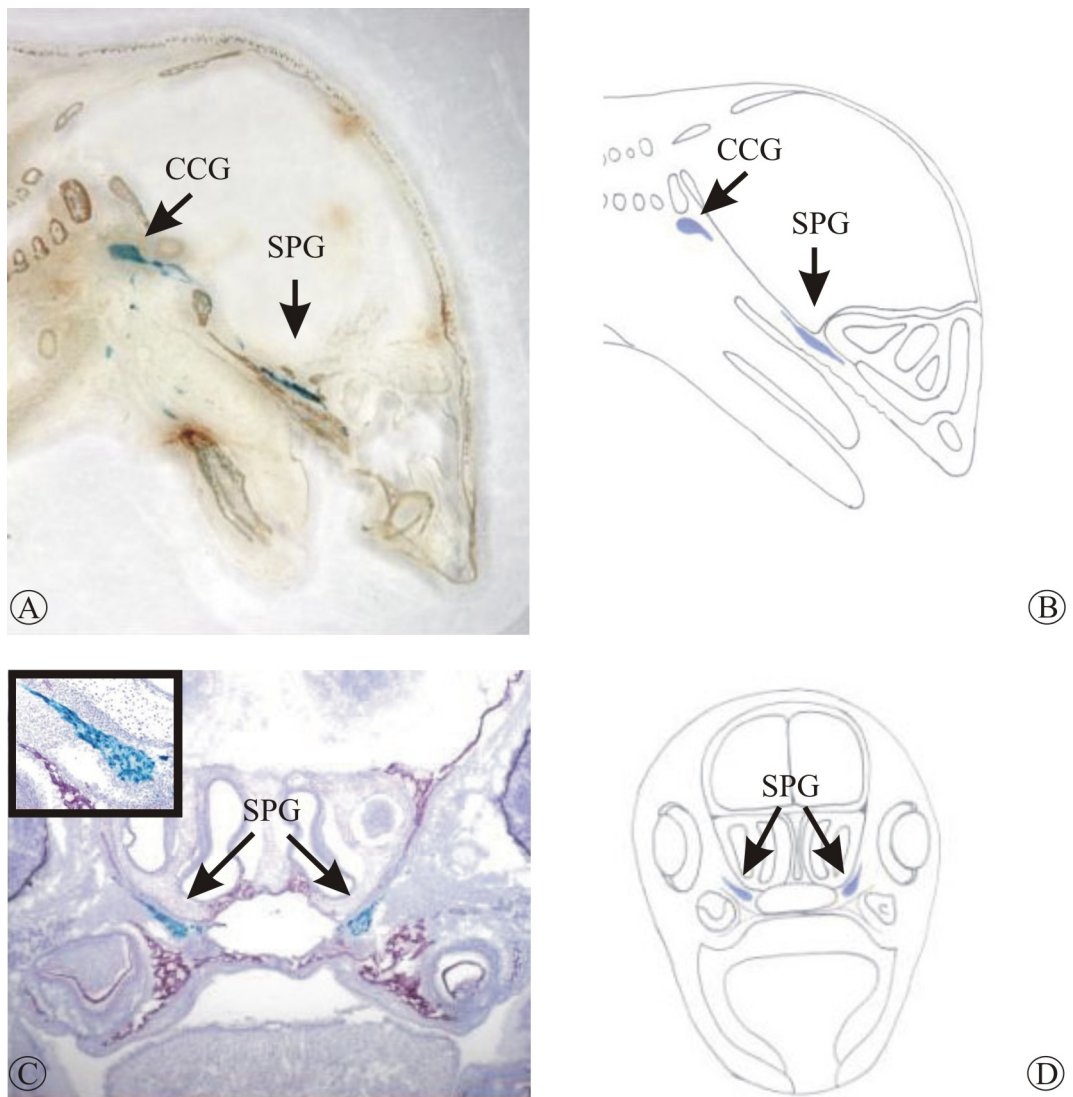


Abbildung 4 : Nachweis der Expression des MOL2.3-Rezeptorproteins in cranialen Ganglien mittels *in situ* Hybridisierung (Weber et al. 2002)

Die linken Abbildungen zeigen X-Gal gefärbte Sagittal- (A) bzw. Coronal-schnitte (C) durch den Kopf einer MOL2.3-IGITL Maus. Es sind deutliche Signale im *Ganglion cervicale craniale* (CCG) (A) und im *Ganglion sphenopalatinum* (SPG) (A, C) zu sehen. Die rechten Abbildungen zeigen schematisch die Lage der Ganglien (B, D) (Weber et al. 2002).

Vom SPG aus ziehen Fasern MOL2.3-exprimierender Zellen zu den lateralen Nasendrüsen und den Harderschen Drüsen. Dort entzweigen sich die Faserbündel und einzelne Fasern ziehen durch das gesamte Drüsengewebe. Weitere Nervenfasern ziehen zu bestimmten Teilen cranialer Blutgefäße, z.B. im Muskelgewebe des Unterkiefers und der Zunge (Abbildung 5).

Außerhalb des Kopfes konnten ebenfalls MOL2.3-positive Gewebe dargestellt werden (Abbildung 5). So entsendet das CCG MOL2.3-positive Fasern zur Herzbasis und feine Faserzweige zur Herzspitze sowie zu Blutgefäßwänden im Herzbereich (Weber et al. 2002). Weitere Projektionsgebiete MOL2.3-positiver Fasern konnten als *Ganglia cervicothoracica* (C8-Th10) und *Truncus sympathicus* (sympathischer Grenzstrang) identifiziert werden. Die MOL2.3-Rezeptor exprimierenden Zellen der *Ganglia cervicothoracica* projizieren in Wände distinkter pulmonaler Alveolen (Weber et al. 2002).

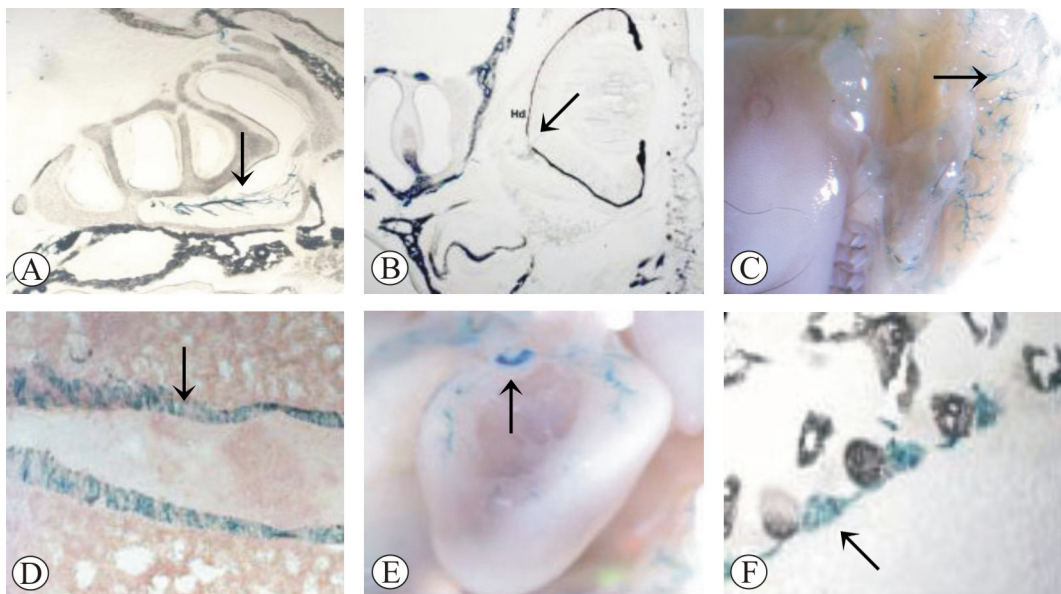


Abbildung 5 : Innervationsgebiete MOL2.3-positiver Zellen

Fasern MOL2.3-positiver Zellen ziehen in die Nasenhöhle, zur lateralen Nasendrüse (A, Sagittalschnitt) und zur Harderschen Drüse (B, Coronalschnitt). Bild C zeigt zahlreiche blau gefärbte Fasern im Bereich der Blutgefäße des Unterkiefers; eine vergrößerte Aufnahme eines Blutgefäßes verdeutlicht, dass die Wände der Gefäße von X-Gal-positiven Fasern innerviert werden (D). Auch das Herz gehört zu den Organen, in denen positive Signale gefunden wurden (E). Außerdem projizieren MOL2.3-positive Fasern zum *Truncus sympathicus* (F) (Weber et al. 2002).

Über potentielle Liganden und die physiologische Funktion des MOL2.3-Rezeptors ist bislang nichts bekannt. Im Folgenden sollen einige Hypothesen hierzu erläutert werden:

Wie bereits erwähnt, scheinen Klasse I Riechrezeptoren (*fish-like*) spezialisiert zu sein auf die Interaktion mit wasserlöslichen Stoffen, wohingegen Klasse II OR flüchtige Stoffe detektieren (Kapitel 1.1) (Breer 2001, Freitag et al. 1995, Freitag et al. 1998, Mezler et al. 2001, Mombaerts 2001). Die nahe Verwandtschaft des MOL2.3-Rezeptors mit Klasse I OR lässt vermuten, dass der Rezeptor möglicherweise mit spezifischen nicht-flüchtigen Molekülen interagiert. Diese Vermutung wird durch die hohe Aminosäuresequenz-Homologie zu bestimmten Peptid- und Adenosinrezeptoren gefestigt (Abbildung 2), deren Liganden ebenfalls wasserlöslich sind (Conzelmann et al. 2000).

Da in der *Area postrema*, einem der circumventrikulären Organe (Ganong 2000), MOL2.3-positive Zellen detektiert wurden, kann angenommen werden, dass der Rezeptor an der Perzeption zirkulierender, hydrophiler „Liganden“, also der Kommunikation zwischen Zirkulation und ZNS beteiligt ist (Conzelmann et al. 2000).

Die Tatsache, dass während der Embryonalentwicklung MOL2.3-positive Zellen zwischen Nasenhöhle und *Bulbus olfactorius* detektiert werden konnten, könnte darüber hinaus die oben erwähnte „*area code*“ Hypothese (Kapitel 1.1) (Dreyer 1998, Hood et al. 1977) unterstützen.

1.2 Die transgene Mauslinie MOL2.3-IGITL

Definitionsgemäß besitzt ein transgenes Tier definierte Veränderungen im Genom, die nicht durch klassische Züchtung oder zufällige Mutagenese zu erreichen wären (Def. TiHo Hannover; http://www.tiho-hannover.de/einricht/zucht/mol_gen/molbiol_5_biotechnik_transgene.pdf).

Schon zu Beginn der 1980er Jahre wurden gentechnische Methoden benutzt, um fremde DNA in Mäusen zu exprimieren. Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden Verfahren entwickelt, mit denen in transgenen Mäusen Gene gezielt inaktiviert werden können (s.g. *Knock-outs*). Mäuse bieten den großen Vorteil, dass man durch Einführung der Gene in Inzucht-Stämme Tiere erhalten kann, deren genetischer Hintergrund weitestgehend identisch ist.

Um die Zellen, welche den MOL2.3-Rezeptor exprimieren, einwandfrei identifizieren zu können, wurde eine transgene Mauslinie generiert. Zur Herstellung der Mauslinie wurde das von Mombaerts et al. (1996) etablierte Prinzip angewandt: Durch homologe Rekombination wurde der MOL2.3-Genlocus so modifiziert, dass IGITL eingefügt wurde (IRES-GFP-IRES-*tau-lacZ*; IRES, *internal ribosome entry*

site). IRES ist ein in die nicht-translatierte RNA integriertes RNA-Segment, welches die Initiierung der Translation vermittelt. IRES-Sequenzen bilden komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, interagieren mit den Translationsmechanismen und werden von einem Start-Codon gefolgt (Jaag et al. 2003, Wimmer and Nomoto 1993). Als Ergebnis wurde unter genspezifischer Promotor-Kontrolle eine sogenannte bicistronische mRNA transkribiert. Auf dieser mRNA ist die Information für den MOL2.3-Rezeptor und für die spezifischen Markerproteine *green fluorescent protein* (GFP) (Tsien 1998) und tau- β -Galaktosidase (*tau-lacZ*) kodiert (Callahan and Thomas 1994) (Abbildung 6). Die IRES-Sequenzen garantieren, dass die Markerproteine GFP und *tau-lacZ* nicht an den MOL2.3-Rezeptor gekoppelt exprimiert werden, da dessen Konformation sich sonst signifikant ändern würde. Das histologische Markerenzym β -Galaktosidase wurde mit dem Mikrotubulus-assoziierten Protein „tau“ fusioniert, damit sämtliche Fortsätze der Zelle sichtbar gemacht werden können (Callahan and Thomas 1994, Drubin and Kirschner 1986). Das GFP dient als Marker für Zellkörper, da es nicht in die Fortsätze der Neuronen transportiert wird (Conzelmann et al. 2000).

Eine histologische Färbung (*lacZ*) bzw. die Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge (ARW 480 nm, EWL 510 nm für GFP) erlauben es nun, diejenigen Zellen zu visualisieren, die das distinkte Rezeptorprotein exprimieren.

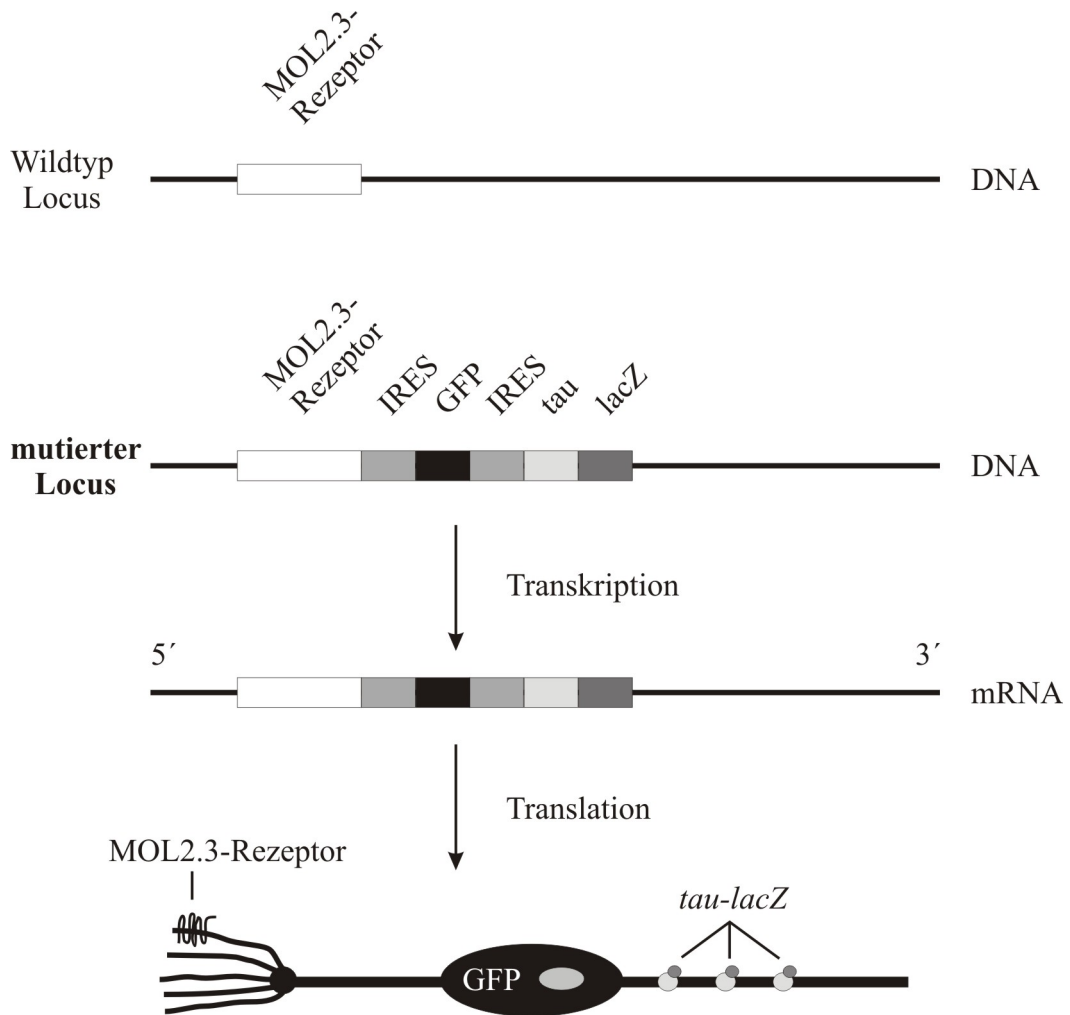


Abbildung 6 : Wildtyp Locus des MOL2.3 Gens sowie die MOL2.3-IGITL Mutation nach homologer Rekombination

Durch homologe Rekombination wurde das Transgen IGITL (IRES-GFP-IRES-*tau-lacZ*) hinter dem Gen für den MOL2.3-Rezeptor auf der DNA eingefügt. Das Ergebnis der Transkription dieser DNA mit dem mutierten Genlocus war eine mRNA, die für den MOL2.3-Rezeptor und die histologischen Markerproteine GFP und *tau-lacZ* codiert. Mit Hilfe des GFP können die Somata der MOL2.3-Rezeptor exprimierenden Zellen visualisiert werden. Das *tau-lacZ* dient als histologischer Marker für die Zellfortsätze. (MOL, *mouse olfactory like*; IRES, *internal ribosome entry site*; GFP, *green fluorescent protein*; *tau-lacZ*, tau- β -Galaktosidase; DNA, Desoxyribonukleinsäure; mRNA, Boten-Ribonukleinsäure)

1.3 Das Ganglion sphenopalatinum

1.3.1 Anatomie des Ganglion sphenopalatinum

Beim Ganglion sphenopalatinum (SPG) (syn. Ganglion pterygopalatinum oder MECKEL Ganglion) handelt es sich um ein parasymphathisches Ganglion; es ist somit ein Teil des autonomen (syn. vegetativen) Nervensystems (VNS) (Akasu and

Nishimura 1995, Kahle 2001, Reuss 2003). Das VNS steuert die Aktivität der inneren Organe und steht, im Gegensatz zum somatischen Nervensystem, nicht unter willkürlicher, bewusster Kontrolle (Klimaschewski 2003). Vegetatives und somatisches Nervensystem dürfen aber nicht als völlig voneinander getrennt betrachtet werden. Während die beiden Nervensysteme in der Peripherie morphologisch und in ihren Effekten meist klar voneinander getrennt werden können, ist diese Trennung zentral, besonders im oberen Hirnstamm, im Hypothalamus und im Großhirn, nicht möglich (Schmidt and Thews 2000). Es bestehen zahlreiche Verbindungen zwischen verschiedensten somatischen und autonomen Zentren im ZNS, sowie zwischen peripheren autonomen Nervenzellen (Jänig 2000). Das VNS kann in einen peripheren und einen zentralen Teil untergliedert werden. Im VNS gibt es z.B. Efferenzen, welche die Viszero- und Sekretomotorik garantieren. In den meisten vegetativen Ganglien divergiert ein präganglionäres Axon auf viele postganglionäre Zellen, und ebenso konvergieren viele präganglionäre Axone auf eine postganglionäre Zelle. Di- und Konvergenz finden wahrscheinlich nur zwischen Neuronen der gleichen vegetativen Endstrecke statt, nicht aber zwischen funktionell verschiedenen Neuronen (Jänig 2000). Entwicklungsgeschichtlich unterscheidet man im VNS einen sympathischen, einen parasympathischen und einen enterischen Anteil (Klimaschewski 2003). Der Parasympathikus wiederum, zu dem wie bereits erwähnt das SPG gehört, kann in einen Kopf- und einen Sacralteil gegliedert werden.

Der Parasympathikus ist als Antagonist des Sympathikus für die trophotropen, d.h. die den Stoffwechsel- und Ernährungszustand des Organismus betreffenden Funktionen verantwortlich. Die Perikarya der präganglionären Neurone des Kopfteils des Parasympathikus liegen in distinkten Kerngebieten des Hirnstamms oder der pontinen Region des Mesencephalon: *Nucleus accessorius oculomotorius* (Ncl. Edinger-Westphal) (Ursprungskern für NIII, *N. oculomotorius*), *Ncl. salivatorius superior* (syn. *cranialis*) (Ursprungskern für NVII, *N. facialis*), *Ncl. salivatorius inferior* (syn. *caudalis*) (Ursprungskern für NIX, *N. glossopharyngeus*), *Ncl. dorsalis nervi vagi* (Ursprungskern für NX, *N. vagus*) und *Ncl. ambiguus* (Ursprungskern für NIX, *N. glossopharyngeus* und NX, *N. vagus*) (Abbildung 8) (Jänig 2000, Kahle 2001). Die Axone dieser präganglionären Neurone bilden zusammen mit anderen, teils motorischen (NIII), teils sensorischen (NIX, X) Nervenfasern die III., VII., IX. und X. Hirnnerven, und ziehen mit diesen in die Peripherie. Hier werden die präganglionären Axone der viszeroefferenten Kerne (viszeromotorisch und -sekretorisch) meist organnah in parasympathischen Hirnnervenganglien auf die zweiten, postganglionären Neurone des Parasympathikus umgeschaltet. Neben der parasympathischen Wurzel besitzt jedes parasympathische Ganglion eine sympathische und eine sensible Wurzel, deren Fasern ohne Unterbrechung efferent

bzw. afferent durch das Ganglion ziehen. Die aus dem Ganglion abgehenden Äste enthalten dann sowohl parasympathische als auch sympathische und sensible Fasern (Kahle 2001).

Die Axone der präganglionären Neurone des *Nucleus salivatorius superior* bilden die parasympathische Wurzel des SPG (Akasu and Nishimura 1995, Contreras et al. 1980, Jänig 2000, Kahle 2001, Larsen 1999). Ein kleiner Teil der Afferenzen des sphenopalatinen Ganglions zieht zu einer Zellgruppe am rostralen Pol des *Nucleus tractus solitarii* (Contreras et al. 1980). Die Fasern des *Nucleus salivatorius superior* ziehen im *N. intermedius* (Teil des *N. facialis*, NVII) in die Peripherie bis zum Fazialisknie, wo ein Teil der parasympathischen Fasern den Hauptstamm des *N. intermedius* verlässt, und als *N. petrosus major* weiterzieht (Reuss 2003). Der Nerv gelangt über die Vorderfläche des Felsenbeins durch das *Foramen lacerum* an die Schädelbasis. Nach dem Durchtritt durch den *Canalis pterygoideus* erreicht der Nerv das SPG. Das Ganglion liegt in der *Fossa pterygopalatina* (Abbildung 7) (Kahle 2001).

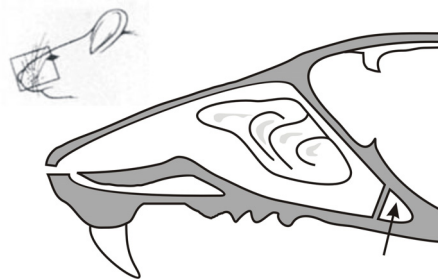


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Lage des Ganglion sphenopalatinum

Das *Ganglion sphenopalatinum* stellt sich bei den verschiedenen Tierarten anatomisch sehr unterschiedlich dar. So existiert es beispielsweise beim Fleischfresser nur einfach (pro Körperhälfte), während beim Pferd 4-5 kleine Ganglien ausgebildet sind und bei Wiederkäuern und Schwein sogar 4-10 (Nickel et al. 1992). Cuthbertson et al. (1997) beschreiben, dass das SPG beim Schwein aus einer Serie von 3-4 untereinander verschalteten Haupt-Mikroganglien, welche jeweils 50-200 Neuronen enthalten, und vielen kleineren Mikroganglien besteht.

Die ganglionären Zellen sind größtenteils multipolare Zellen, mit langen, verzweigten Dendriten. Die intraganglionären Nervenfasern sind dünn und unmyelinisiert (Akasu and Nishimura 1995). Im SPG wurden verschiedene Zelltypen beschrieben: Haupt-Neurone (*principal neurons*) und SIF-Zellen (SIF, *small intensiv fluorescent*), sowie einige intermediäre Zellen (Kiyama et al. 1993, Leblanc and Landis 1989). Die Hypothese, dass SIF-Zellen die Vorläufer für autonome Neurone

darstellen, wurde von Leblanc and Landis (1989) weitestgehend widerlegt, da sie zeigen konnten, dass SIF-Zellen erst zu einem relativ späten Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung erscheinen.

Die vom SPG abgehenden Nervenäste führen postganglionäre, vaso- und sekretomotorische Fasern zu Drüsen und Blutgefäßen im Bereich des Auges, der Nasenhöhle und des Gaumens (Abbildung 8) (Akasu and Nishimura 1995, Seylaz et al. 1988):

Ein Teil der das Ganglion verlassenden, postganglionären Fasern zieht in den *Rami ganglionares* zum *N. maxillaris* und erreicht über den *N. zygomaticus* und seine Anastomose zum *N. lacrimalis* (*Ramus communicans*) die Tränendrüse und die Meibomschen Drüsen (Jänig 2000, Kahle 2001, Nickel et al. 1992).

Auch die Harderschen Drüsen erhalten nervalen Eingang vom *Ganglion sphenopalatinum* (Cuthbertson et al. 1997, Motosugi et al. 1992). Die Harderschen Drüsen, auch tiefe Nickhautdrüsen genannt, liegen an der Medialfläche und unter den oberflächlichen Nickhautdrüsen (Nickel et al. 1992). Sie produzieren ein serös-muköses Sekret, das sich der Tränenflüssigkeit beimengt (Wiesner and Ribbeck 1991).

Die lateralen Nasendrüsen, welche ventral der nasalen Turbinalien lokalisiert sind, gehören ebenfalls zu den sekretorisch innervierten Zielgeweben des SPG (Grunditz et al. 1994).

Weitere parasymphatische sekretorische Fasern ziehen in den *Rami orbitales* zu den hinteren Siebbeinzellen und in den *Rami nasales posteriores laterales* zu den *Glandulae nasales* der Nasenmuscheln (Hanazawa et al. 1993, Jeon et al. 1997, Lee et al. 1995a). Die *Glandulae nasales* werden außerdem über den *N. nasopalatinus* und die *Nn. palatini minores* viszeromotorisch vom SPG innerviert (Hara et al. 1993, Kahle 2001). Die sensible Innervation der Nasenhöhle wird von den *Rami ganglionares* garantiert.

Die *Rami alveolares* der sphenopalatinen Ganglien sorgen für die viszeromotorische Innervation des *Sinus maxillaris*, der Nasenwand sowie der Zähne (Reuss 2003).

Der vordere Bereich des Gaumens wird über den *N. nasopalatinus* (*incisivus*) versorgt, welcher vom SPG aus über die Nasenscheidewand und durch den *Canalis incisivus* zum Gaumen zieht. Die *Nervi palatini* innervieren die *Glandulae palatinae* des harten und weichen Gaumens (Hara et al. 1993), und führen wie der *N. petrosus major* afferente Geschmacksfasern für den weichen Gaumen (Kahle 2001). Diese viszerosensiblen Fasern (*Rami ganglionares*) projizieren wiederum zum *Nucleus tractus solitarii*, in welchem der MOL2.3-Rezeptor ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Kapitel 1.1) (Reuss 2003).

Der *Ramus pharyngeus*, welcher vom SPG aus in die Peripherie zieht, innerviert die *Glandulae pharyngis* (Hara et al. 1993, Reuss 2003). Auch der obere Pharynx wird sensibel von den *Rami ganglionares* versorgt (Kahle 2001).

Außerdem innerviert das SPG die Wände verschiedener Blutgefäße im Kopfbereich parasymphatisch (Hara et al. 1993, Owman et al. 1974). So konnte mit Hilfe verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die *Arteria ophthalmica* (Elsas et al. 1996b), stromale Kapillaren (Lin et al. 1996) sowie die Blutgefäße des *Circulus arteriosus cerebri* und deren Abzweigungen (Edvinsson et al. 2001, Edvinsson et al. 1989, Suzuki et al. 1988) Nervenfasern vom SPG erhalten. Beim *Circulus arteriosus cerebri* handelt es sich um einen an der Gehirnbasis lokalisierten geschlossenen, den Hypophysenstiel umfassenden, länglichen Arterienring.

Für die Ratte konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Epiphyse parasymphatische Innervation vom SPG erhält (Larsen 1999, Moller and Liu 1999).

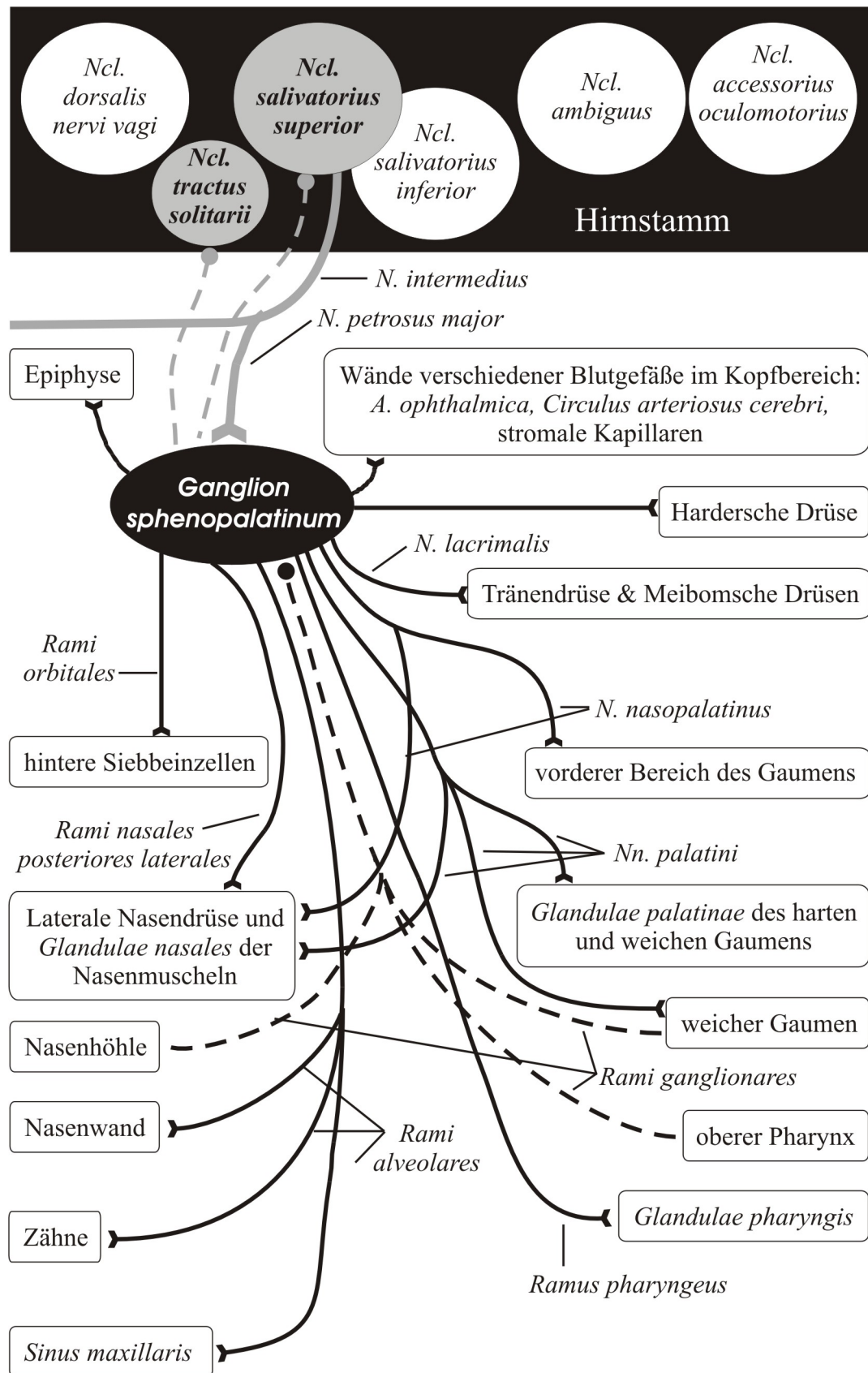


Abbildung 8 : Schematische Darstellung der prä- und postganglionären Fasern des Ganglion sphenopalatinum

Dargestellt sind die präganglionären Neurone in den parasympathischen Kerngebieten des Hirnstamms. Die Axone der präganglionären Neurone (grau)

ziehen zum SPG, wo sie auf die postganglionären Neurone umgeschaltet werden, welche wiederum zu den verschiedenen Innervationsgebieten des SPG projizieren (schwarze Linien). Die viszeromotorischen Fasern sind als durchgezogene Linien dargestellt, die sensiblen Fasern als gestrichelte Linien (genauer siehe Text).

1.3.2 Physiologie des Ganglion sphenopalatinum

Die Hauptfunktion des SPG ist es, die oben genannten Drüsen des gesamten nasopharyngealen Bereichs parasympathisch viszeromotorisch und -sekretorisch zu innervieren (Akasu and Nishimura 1995, Seylaz et al. 1988). Außerdem ist das SPG für die sensible Innervation eines großen Teils des nasopharyngealen Bereichs verantwortlich (Kahle 2001).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass das SPG neurogen den cerebralen Blutfluss beeinflusst. Durch das Ganglion kann der cerebrale Blutfluss sowohl gesteigert als auch vermindert werden (Goadsby et al. 1996, Liu et al. 2002). Das SPG scheint als Teil des parasympathischen Nervensystems eine protektive Funktion für die cerebrale Zirkulation zu haben (Goadsby et al. 1996).

Zudem häufen sich Hinweise darauf, dass das Ganglion eine große Rolle bei der Schmerzentstehung verschiedener Erkrankungen spielt. So wird das SPG immer wieder in einen Zusammenhang mit der Sphenopalatinen- und Trigeminale-Neuralgie, mit Migräne, Cluster-Kopfschmerz sowie dem Krankheitsbild des atypischen Gesichtsschmerzes gebracht (Day 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dem SPG eine Schlüsselrolle bei der Transmission neuronaler Signale von sowohl höheren als auch peripheren Zentren zukommt (Hoshino et al. 1998).

1.4 Transmittersysteme in vegetativen Ganglien

Neurotransmitter dienen der Erregungsübertragung an chemischen Synapsen. Die synaptische Übertragung von den präganglionären Axonen auf die postganglionären Neurone des Parasympathikus erfolgt dabei im wesentlichen cholinerg (Jänig 2000, Seylaz et al. 1988, Skok 2002, Suzuki and Hardebo 1993). In der Literatur wird allerdings das Vorhandensein weiterer Transmittersysteme beschrieben, wobei besonders dem Neuromodulator Stickstoffmonoxid (NO) eine bedeutende Rolle zugesprochen wird (Goadsby et al. 1996, Kimura et al. 1997, Liu et al. 2002, Nozaki et al. 1993). Auch dem Neuropeptid *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) wird eine funktionelle Rolle im SPG zugeschrieben (Edvinsson et al. 2001, Elsas et al. 1996a).

1.4.1 Das cholinerge System

Den wichtigsten Neurotransmitter aller prä- und postganglionären parasympathischen Neurone stellt Acetylcholin (ACh) dar, der Essigsäureester des Aminoalkohols Cholin. Die Substanz wurde in der ersten Hälfte des 20. Jahrhundert erstmals von Loewi und Dale als endogener Transmitter erkannt und als „Vagusstoff“ bezeichnet (Bennett 1997, 2000, Tansey 1991).

Cholinerge Zellen sind alle präganglionären autonomen Neurone, postganglionär-parasympathische Neurone, zahlreiche Neurone des Darmnervensystems sowie postganglionär-sympathische Neurone zu den Schweißdrüsen und Motoneurone zur quergestreiften Muskulatur (Forth et al. 2001).

Der klassische Neurotransmitter Acetylcholin wird im Zytoplasma der Perikarya, zum Teil auch in den jeweiligen Nervenendigungen, durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-Coenzym A synthetisiert (Lodish et al. 2001, Tohyama and Takatsuji 1998). Der vesikuläre Acetylcholin Transporter (VACHT) transportiert das Acetylcholin dann in die synaptischen Vesikel (Gilmor et al. 1996, Roghani et al. 1994, Varoqui and Erickson 1996). Auslöser für die Freisetzung des ACh in den synaptischen Spalt ist ein Aktionspotential, welches an der präsynaptischen Membran ankommt. Dieses bewirkt die Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle, durch die dann Ca^{2+} in die Axonterminale einströmt. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration setzt den Mechanismus der Exozytose in Gang, durch den schließlich das Acetylcholin aus den Speichervesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. ACh diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran und bindet dort an den entsprechenden Rezeptor. Um eine schnelle und kurzfristig wiederholbare, neuronale Signalübertragung zu gewährleisten, muss Acetylcholin schnell inaktiviert werden. Diese schnelle Inaktivierung garantiert das Enzym Acetylcholinesterase, welches im Extrazellulärraum ACh spaltet. Das hierbei anfallende Cholin wird in die synaptische Endigung aufgenommen und dort wiederverwertet (Lodish et al. 2001).

Die Rezeptoren für ACh sind in der postsynaptischen Membran der entsprechenden, nachgeschalteten Zelle (postganglionäres Neuron oder Effektorzelle) lokalisiert, oder aber präsynaptisch. Dale erkannte bereits 1914, dass es zwei Familien von Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) gibt. Nach zwei selektiven Agonisten wurden die unterschiedlichen Gruppen als nicotinerge (nach dem Alkaloid der Tabakpflanze) und muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nach einem Alkaloid, welches z.B. im Fliegenpilz vorkommt) bezeichnet (Jänig 2000). Es gibt Zellen, die nur einen dieser beiden Rezeptor-Typen exprimieren, es ist aber auch möglich, dass ein Neuron beide Typen gleichzeitig exprimiert (Tohyama and Takatsuji 1998).

Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) sind hochmolekulare Glykoproteine, welche z.B. für die Übertragung der Impulsaktivität in vegetativen Ganglien verantwortlich sind (Klimaschewski 2003). Sie bilden pentamere Kationenkanäle, die in der Membran postganglionärer Neurone lokalisiert sind, also auch in den Neuronen des SPG. Bindet Acetylcholin an einen solchen Rezeptor, so erhöht sich die Kationenpermeabilität der Zellmembran für monovalente Kationen und Ca^{2+} (Adams and Nutter 1992, Girod et al. 2000, Gray et al. 1996, Rathouz et al. 1996, Rogers et al. 1997). ACh vermittelt hier also die synaptische Transmission. Der Ca^{2+} -Einstrom durch neuronale nAChR reguliert die Leitfähigkeit anderer Ionenkanäle (Mulle et al. 1992) und die Freisetzung von Neurotransmittern (Wonnacott 1997). Zusätzlich zur postsynaptischen Lokalisation kommen einige nAChR in synaptischen Endigungen vor, wo sie einen signifikanten Ca^{2+} -Einstrom bewirken und so die Neurotransmitterfreisetzung modulieren (siehe unten) (Skok 2002).

Pentamere neuronale nAChR sind generell aus vier unterschiedlichen Untereinheiten (α , β , γ und δ) zusammengesetzt. In neuronalen nAChR autonomer Ganglien konnten bis jetzt jedoch vorrangig die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$ und $\beta 4$ in den verschiedensten pentameren Konfigurationen nachgewiesen werden (Anand et al. 1993, Colquhoun and Patrick 1997, Skok 2002, Yu and Role 1998). Die Bindungsstellen für ACh liegen auf den α -Untereinheiten. Die $\alpha 3$ -Untereinheit ist die am häufigsten in autonomen Ganglien vorkommende α -Untereinheit und bildet mit anderen α - und β -Untereinheiten heteromultimere nAChR. Sehr oft kommt die Kombination $\alpha 3/\beta 4$ vor, die auch als „Ganglien-Typ nAChR“ bezeichnet wird (Ragozzino et al. 1998). $\alpha 3/\beta 4$ nAChR kommen auch in präsynaptischer Lokalisation vor (Kulak et al. 2001). Auch homomere $\alpha 7$ Rezeptoren werden in vielen autonomen Ganglien beschrieben, wo sie sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sind (Si and Lee 2001). $\alpha 7$ Rezeptoren sind gekennzeichnet durch schnelle Desensibilisierung und eine hohe Ca^{2+} -Permeabilität (Girod et al. 2000, Gray et al. 1996, Skok 2002). Die Ca^{2+} -Permeabilität der nAChR variiert zwischen den verschiedenen Rezeptortypen deutlich. So ist der Ca^{2+} -Strom durch $\alpha 3/\beta 4$ nAChR geringer als durch homomere $\alpha 7$ nAChR. Die Kombinationen verschiedener Untereinheiten unterscheiden sich nicht nur zwischen den verschiedenen Ganglien, sondern auch zwischen verschiedenen Neuronen eines Ganglions (Skok 2002).

Bei den muscarinergen AChR (mAChR) dagegen handelt es sich um GPCRs. Man unterscheidet zur Zeit bei den mAChR die fünf Untertypen M_1 - M_5 . Die M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren stimulieren über ein G-Protein die Phosphatidylinositidspezifische Phospholipase C, M_2 - und M_4 -Rezeptoren hemmen über G-Proteine die Adenylatzyklase (M_4) und/oder öffnen K^+ -Kanäle (M_2). Auch in der Gewebeverteilung der mAChR gibt es Unterschiede, aber auch Überlappungen. M_1 -

Rezeptoren kommen vorwiegend in Neuronen vor, aber auch in der Lunge. M₂-Rezeptoren dagegen findet man besonders in den Membranen von Herzmuskelzellen, sie konnten aber immunhistologisch auch in SPG nachgewiesen werden (siehe unten) (Liu et al. 2002). M₂-Rezeptoren spielen außerdem eine bedeutende Rolle als präsynaptische Autorezeptoren (Kitaichi et al. 1999, Lee et al. 2001, Rouse et al. 2000). M₃-Rezeptoren kommen vor allem auf Drüsen- und glatten Muskelzellen vor, aber auch im ZNS.

Schon lange wird die Existenz modulatorischer Systeme diskutiert, welche die ACh-Freisetzung kontrollieren. Es konnte gezeigt werden, dass solche Kontrollsysteme sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem weit verbreitet sind (Rouse et al. 2000), wobei die ACh-Freisetzung hoch- oder herunterreguliert werden kann. Diese Regulation kann über ACh selbst (Autoregulation) (Girod et al. 2000), oder aber über andere Neuromediatoren (Heteroregulation) erfolgen (Re 1999). Die Autoregulation erfolgt über die Bindung eines Agonisten an präsynaptische AChR. Die positive Modulation ist hierbei nicotinerg vermittelt, die negative muscarinerg (M₂-Rezeptoren) (D'Agostino et al. 2000, Fu et al. 1998, Girod et al. 2000, Kitaichi et al. 1999, Lee et al. 2001, Marchi et al. 1999, Re 1999).

Die Existenz und die funktionelle Bedeutung des klassischen Neurotransmitters Acetylcholin im SPG wurde bereits bei verschiedenen Tierarten untersucht. So konnte ChAT als cholinerg Marker in Somata und Neuriten der Ratte nachgewiesen werden (Hara et al. 1985, Liu et al. 2000c, Suzuki et al. 1990c, Suzuki et al. 1990a). Laut Suzuki et al. (1989) sind es die Haupt-Neurone des SPG (Kapitel 1.3.1), welche ChAT-positiv sind. Bei der Katze sollen etwa 50 % aller neuronalen Zellen ChAT-immunreaktiv sein (Kimura et al. 1997), beim Schwein 75 % (Yu et al. 1998). Vom SPG ausgehende, ChAT-immunreaktive Fasern, ziehen sowohl bei der Ratte, als auch beim Schwein zu cerebralen Blutgefäßen (Suzuki et al. 1990c, Suzuki et al. 1990b, Yu et al. 1998), wobei die cholinerge Innervation cerebraler Blutgefäße nicht ausschließlich vom SPG ausgeht (Dauphin et al. 1991).

Funktionell steht das cholinerge System des SPG folglich im Zusammenhang mit der Steuerung des cerebralen Blutflusses (Seylaz et al. 1988, Suzuki and Hardebo 1993). Es konnte beobachtet werden, dass die Stimulation prä- und postganglionärer Fasern des SPG der Ratte den cerebralen Blutfluss erhöht (Suzuki and Hardebo 1993). Die Steuerung der Vasomotorik wird allerdings nur indirekt durch Acetylcholin gesteuert. So konnte für das Schwein gezeigt werden, dass ACh über die Regulation der präsynaptischen NO-Freisetzung einen Einfluss auf die cerebrale, neurogene Vasodilatation ausübt (Yu et al. 1998). Eine detailliertere Beschreibung dieses Mechanismus erfolgte bei der Ratte, bei welcher der immunhistochemische Nachweis der Expression muscarinerger ACh-Rezeptoren (M₂-Rezeptoren) in

Somata und Dendriten gelang. Eine Aktivierung dieser präsynaptischen Rezeptoren vermindert den Ca^{2+} -Einstrom durch N-Typ Ca-Kanäle, wodurch wiederum keine NO-Freisetzung mehr erfolgt (Liu et al. 2002).

1.4.2 Das nitrerge System

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein hochdiffusibles, kurzlebiges, endogen gebildetes bioaktives Molekül. Es kommt in Neuronen sowie in Endothel- und Immunzellen vor, wo es als Neuromodulator oder Botenstoff fungiert (Alcayaga et al. 1999, Anderson et al. 1995, Bredt et al. 1990, Forth et al. 2001). Stickstoffmonoxid wird unter Katalyse des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) gebildet (Evans et al. 1995). NOS katalysiert die Reaktion von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und L-Citrullin (Bredt and Snyder 1990, Bult et al. 1990, Knowles et al. 1989). Es sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt: Die neuronale NO-Synthase I (nNOS), die induzierbare NO-Synthase II (iNOS) sowie die endotheliale NO-Synthase III (eNOS) (Alderton et al. 2001, Evans et al. 1995, Forth et al. 2001). Die neuronale NO-Synthase (nNOS) ist ein lösliches Enzym, welches in der Zelle an Membranen gebunden lokalisiert ist und durch Calcium aktiviert wird (Wenisch et al. 2000). So führt ein Aktionspotential, welches in einer Nervenendigung eintrifft, über den Ca^{2+} -Einstrom zur Aktivierung der NO-Synthase. Neurone mit NO-Synthase werden als nitrerg bezeichnet (Boeckxstaens et al. 1993, Bredt and Snyder 1990, Evans et al. 1995).

Mehrere Besonderheiten unterscheiden NO von anderen Neurotransmittern. Bei NO handelt es sich im Gegensatz zu anderen Transmittern um ein anorganisches Molekül, welches zudem gasförmig und somit vollkommen membrangängig ist. NO wird außerdem nicht in Vesikeln gespeichert. Neuronal produziertes NO ist extrem kurzlebig (Krukoff 1999, Lancaster 1994), die mittlere biologische Halbwertszeit beträgt 0,09-2 Sekunden im extravaskulären Raum (Thomas et al. 2001), bzw. 1,8 ms im Blut (Liu et al. 1998). Das anorganische Molekül diffundiert leicht durch biologische Membranen und kann im neuronalen System Strecken von bis zu 200 μm überwinden (Krukoff 1999, Lancaster 1997). Der Rezeptor für NO ist folglich kein Zellmembranprotein, sondern eine lösliche Guanylatzyklase, ein zytoplasmatisches Enzym, das die Synthese von GTP zu cGMP katalysiert, welches wiederum als intrazellulärer 2nd messenger fungiert (de Vente et al. 2001, Murad 1999, Southam and Garthwaite 1993).

Im Zentralnervensystem ist NO an der langfristigen Modulation synaptischer Transmission beteiligt (Arancio et al. 1996, Snyder 1992), im peripheren Nervensystem dient es als atypischer Neurotransmitter (Sato and Kawatani 1996).

Atypische deshalb, weil das Zielmolekül kein Membranrezeptor ist, sondern ein intrazelluläres Enzym.

NO kommt normalerweise in Form eines Radikals vor (Dawson et al. 1992, Murad 1999), und wirkt als solches hochgradig cytotoxisch und bakteriostatisch (Heiss et al. 1994, Kaplan et al. 1996, Lancaster 1995). Dies erklärt die Notwendigkeit einer schnellen Elimination von NO. In biologischen Flüssigkeiten wird Stickstoffmonoxid innerhalb weniger Sekunden zu Nitrit und Nitrat oxidiert. Da diese anorganischen Moleküle etwa 1000-fach weniger wirksam sind als NO ist davon auszugehen, dass die Oxidation der Inaktivierung des NO dient (Forth et al. 2001).

In präganglionären, parasympathischen Neuronen des Hirnstamms, welche zum SPG projizieren, konnte die Co-Lokalisation von nNOS und ChAT gezeigt werden. Dies führte zu der Hypothese, dass NO zum einen die cholinerge Transmission präganglionärer Nervenendigungen im SPG beeinflussen (Zhu et al. 1997), und zum anderen *per se* als parakriner Botenstoff fungieren könnte.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten indirekt über den Nachweis der NOS bzw. NADPH-Diaphorase (Dawson et al. 1991) die Synthese von NO in Zellsomata und –neuriten des SPG zeigen. Zu den Tierarten, bei denen der NOS-Nachweis gelang, gehören die Ratte (Edvinsson et al. 2001, Hanazawa et al. 1994, Lee et al. 1995a, Lee et al. 1995b, Liu et al. 2000c, Morris et al. 1993, Uddman et al. 1998), die Katze (Goadsby et al. 1996, Kimura et al. 1997), das Kaninchen (Runer et al. 1998), das Meerschweinchen (Shimizu et al. 2001), das Schwein (Yu et al. 1997, Yu et al. 1998) und der Mensch (Uddman et al. 1999).

Retrograde Tracing-Studien mit dem Farbstoff *True Blue* zeigten, dass perivaskuläre, NOS-positive Nervenfasern aus dem Bereich des *Circulus arteriosus cerebri* ihren Ursprung im SPG haben (Edvinsson et al. 2001). NO wird in der cerebralen Zirkulation die Funktion zugesprochen, eine Dilatation von Blutgefäßen auszulösen (Goadsby et al. 1996, Kimura et al. 1997, Nozaki et al. 1993). ACh soll hier eine modulierende Funktion auf die NO-Freisetzung haben (Kimura et al. 1997, Yu et al. 1998). Die Gefäßwände der *Arteria ophthalmica* werden ebenfalls von NOS-haltigen Nervenfasern des SPG innerviert (Elsas et al. 1996b). Auch bei der nervösen Kontrolle der Nasenschleimhaut hinsichtlich Durchblutung und Sekretion wird NO eine Rolle als nicht-cholinergem, parasympathischem Neurotransmitter beigemessen (Hanazawa et al. 1993, Jeon et al. 1997, Lacroix et al. 1998, Lee et al. 1995b). Broillet und Firestein (1996b, 1997) und Schmachtenberg et al. (2003) konnten zudem zeigen, dass NO direkt olfaktorische, durch zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP) gesteuerte Ionenkanäle aktivieren kann. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben wurden, garantieren diese Kanäle die Entstehung einer zellulären

Depolarisation nach Bindung eines adäquaten Liganden an einen olfaktorischen Rezeptor.

1.4.3 Das PACAPerge System

Das Neuropeptid *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) wurde zuerst aus der Hypophyse des Schafes isoliert. Der Name des Peptids basiert auf seiner Fähigkeit, in Zellkulturen der Hypophyse der Ratte die Adenylatzyklase zu aktivieren. PACAP ist sehr eng mit dem Vasoaktiven Intestinalen Polypeptid (VIP) verwandt, und Mitglied einer Familie regulatorischer Peptide (Miyata et al. 1989, Miyata et al. 1990).

PACAP konnte in unterschiedlichen Strukturen des Körpers nachgewiesen werden, vor allem in neuronalen Geweben, darunter auch das *Ganglion sphenopalatinum* (Edvinsson et al. 2001, Elsas et al. 1996a, Liu et al. 2000b, Nielsen et al. 1998, Uddman et al. 1999). Einige der PACAP-exprimierenden Neurone des SPG projizieren zu Blutgefäßen des *Circulus arteriosus cerebri* (Edvinsson et al. 2001). Auch in den Tränendrüsen und verschiedenen Blutgefäßen des Auges konnte, ebenso wie in Zellen des SPG, PACAP-Immunreaktivität nachgewiesen werden. (Elsas et al. 1996a) stellten daraufhin die Hypothese auf, dass neuronales PACAP im Auge, welches möglicherweise im SPG produziert wird, an der glandulären Sekretion, der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur sowie sensorischen Prozessen beteiligt ist.

Basierend auf ihrer relativen Affinität für PACAP und VIP können verschiedene PACAP Bindungsstellen unterschieden werden: PACAP Typ I Rezeptoren binden spezifisch PACAP und existieren in mindestens 7 Splicevarianten. Diese Rezeptor-Isoformen sind an Phospholipase C- und/oder Adenylatzyklase-Aktivität gebunden. Eine Ausnahme bildet eine Isoform, welche an die Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle gekoppelt ist (Chatterjee et al. 1996, Pantaloni et al. 1996, Spengler et al. 1993). PACAP Typ II Rezeptoren binden PACAP und VIP mit ähnlich hoher Affinität und sind an Adenylatzyklase-Aktivität gekoppelt (Ishihara et al. 1992, Lutz et al. 1993). Ein dritter PACAP Rezeptorsubtyp bindet sowohl PACAP als auch VIP mit hoher Affinität und ist an Adenylatzyklase- und Phospholipase C-Aktivierung gekoppelt (Inagaki et al. 1994).

In der Literatur wird beschrieben, dass weder mRNA für VPAC2- noch für PAC1-Rezeptoren (VIP- bzw. PACAP-Rezeptoren; VPAC, VIP Typ PACAP; PAC1, PACAP Typ 1) im *Ganglion sphenopalatinum* des Menschen detektiert werden konnte. Allerdings wurde mRNA für einen VPAC1-Rezeptor nachgewiesen (Knutsson and Edvinsson 2002).

1.5 Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff

Calcium hat für die unterschiedlichsten Körperfunktionen eine herausragende biologische Bedeutung. So ist es unter anderem essentiell für die Muskelkontraktion, die Zellteilung, den Zilienschlag sowie für die Eischalen- und Knochenbildung. Außerdem ist Ca^{2+} ein ubiquitärer intrazellulärer Botenstoff. Damit Ca^{2+} als intrazelluläres Signal genutzt werden kann, muss die Ruhe-Konzentration im Zytosol niedrig sein. Die Konzentration an freiem Ca^{2+} im Zytosol jeder Zelle liegt bei $\leq 10^{-7}$ M/l, wogegen die Konzentrationen in der Extrazellulärflüssigkeit, im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern und in den Mitochondrien ($\approx 10^{-3}$ M/l) hoch sind (Tsien and Poenie 1986). Es bestehen also deutliche Konzentrationsgradienten zwischen dem Extra- und dem Intrazellulärraum einerseits, und dem Cytosol und den intrazellulären Kompartimenten ER, Zellkern, und Mitochondrien andererseits (Alberts and Johnson 2001).

Im Folgenden soll eine Übersicht über den zellulären Calciumstoffwechsel gegeben werden (Abbildung 9):

Extrazelluläres Ca^{2+} kann über spannungs- und rezeptorabhängige Kanäle ins Zytosol gelangen. In Nervenzellen führt eine durch ein Aktionspotential hervorgerufene Depolarisation zur Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran. Es kommt zu einem Ca^{2+} -Influx in die Nervenendigung, wodurch die Sekretion von Neurotransmittern initiiert wird. Rezeptorabhängige Kanäle können entweder direkt durch einen Liganden reguliert werden (ligandengesteuerter Ca^{2+} -Kanal), oder aber indirekt über eine 2nd messenger Kaskade nach Aktivierung eines GPCRs durch den entsprechenden Liganden (Nordheim and Lammers 2003). GPCR können außerdem über den 2nd messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER bewirken. Hierbei bindet ein entsprechendes extrazelluläres Signalmolekül an einen GPCR, welcher dann die Phospholipase C- β aktiviert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG). Durch IP_3 wird die Rezeptoraktivierung an die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER gekoppelt, denn IP_3 bindet an IP_3 -gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Membran des ER und setzt so Ca^{2+} aus dem ER frei. Der initiale cytosolische Ca^{2+} -Anstieg und DAG aktivieren eine Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PKC), welche bestimmte Proteine in der Zielzelle (z.B. Ionenkanäle) phosphoryliert (Alberts and Johnson 2001). IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Rekrutierung aus dem ER kann auch nach Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase erfolgen (Nordheim and Lammers 2003).

Wie bereits erwähnt, muss die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol ruhender Zellen niedrig gehalten werden, um die Signalmechanismen über den 2nd messenger Ca^{2+} zu ermöglichen. Zu diesem Zweck stehen der Zellen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: In allen eukaryotischen Zellen befinden sich Ca^{2+} -ATPasen in der

Zellmembran, welche Ca^{2+} aus der Zelle pumpen. Nerven- und Muskelzellen haben einen zusätzlichen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in ihrer Zellmembran, welcher den Ca^{2+} -Efflux an einen Na^+ -Influx koppelt. Eine Ca^{2+} -ATPase in der Membran des ER ermöglicht die Aufnahme großer Ca^{2+} -Mengen aus dem Zytosol gegen einen steilen Konzentrationsgradienten (Alberts and Johnson 2001).

Die Wirkung des zytoplasmatischen Ca^{2+} wird durch Bindung an verschiedene intrazelluläre Proteine beeinflusst. Calretinin und Calbindin sind Calciumbindungsproteine, welche den Ca^{2+} -Spiegel abpuffern (Nordheim and Lammers 2003). Calbindin dient zusätzlich dem transzellulären Ca^{2+} -Transport. Das Calciumeffektorprotein Calmodulin dagegen ist ein vielseitiger, intrazellulärer Ca^{2+} -Rezeptor und vermittelt verschiedene Ca^{2+} -regulierte Prozesse. Der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex selbst besitzt keine enzymatische Aktivität, sondern wirkt durch Bindung an andere Proteine (Alberts and Johnson 2001). Die meisten Ca^{2+} /Calmodulin-Effekte werden indirekt über Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Protein-Kinasen (CaM) vermittelt, welche wiederum Serin- oder Threonin-Reste von Proteinen phosphorylieren. Die am besten untersuchte multifunktionelle CaM-Kinase ist die CaM-Kinase II; sie konnte in allen tierischen Zellen nachgewiesen werden, und kommt besonders im Nervensystem (hier vor allem in den Synapsen) in grosser Menge vor (Alberts and Johnson 2001).

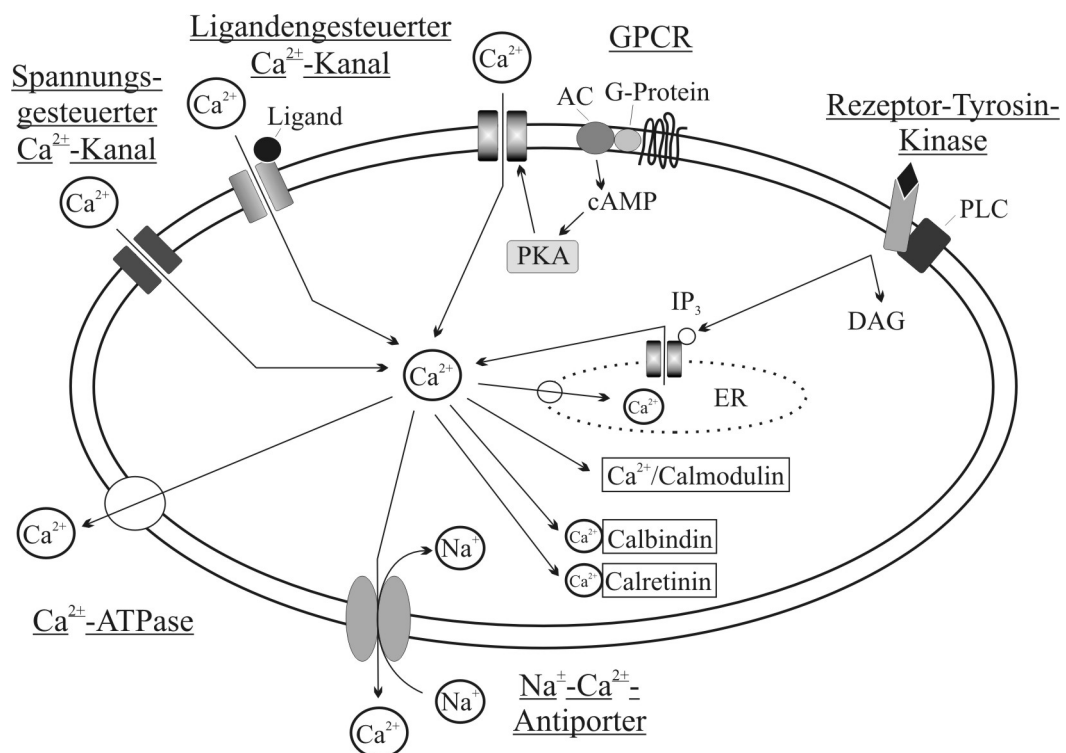


Abbildung 9 : Der zelluläre Calciumstoffwechsel

Ca^{2+} gelangt über Kanäle in der Zellmembran und der Membran des ER ins Zytosol. Calciumpumpen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportieren das Ca^{2+} wieder

aus der Zelle hinaus, bzw. zurück ins ER. In der Zelle wird die Ca^{2+} -Wirkung durch verschiedene Proteine beeinflusst (Details siehe Text). (AC, Adenylatzyklase; DAG, Diacylglycerin; PKA, Protein-Kinase A; PLC, Phospholipase C_γ)

1.6 Ziele der Arbeit

Um einerseits einen Hinweis auf die mögliche Bedeutung des MOL2.3-Rezeptors im Rahmen der ganglionären Signalübertragung zu erlangen, und andererseits grundlegende Transmittercharakteristika des SPG zu erarbeiten, erfolgte in dieser Arbeit eine detaillierte immunhistochemische und zellphysiologische Charakterisierung der Rezeptor-exprimierenden Zellen des *Ganglion sphenopalatinum*. Die Schwerpunkte wurden besonders auf das cholinerge und das nitrerge Transmittersystem MOL2.3-positiver im Vergleich zu MOL2.3-negativen Neuronen gelegt, aber auch das PACAPerge System wurde untersucht.

Mittels immunhistochemischer Methoden wurde eine Analyse des neurochemischen Codes MOL2.3-positiver und -negativer Zellen durchgeführt. Vor allem sollte die Expression von GFP, dem histologischen Marker für den MOL2.3-Rezeptor, sowie die Expression des neuronalen Markers NSE, der cholinergen Markerproteine ChAT und VAcHT und des nitrergen Markers nNOS in den ganglionären Zellen untersucht werden. Hier erfolgte auch eine quantitative Erfassung der immunologisch detektierten Zellen, welche die Quantifizierung der Co-Lokalisation der verschiedenen Antigene beinhaltete. Weiterhin wurde die Expression der Botenstoffe PACAP und Substanz P untersucht, sowie deren Co-Lokalisation mit dem MOL2.3-Rezeptor.

Um die Zellen funktionell zu untersuchen, war zunächst die Etablierung einer primären Zellkultur notwendig. Anhand dieser Zellkultur erfolgte die Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktion mit Hilfe der Calcium-Imaging Technik. Hauptaugenmerk war die detaillierte Untersuchung der cholinerg, nitrerg und PACAPerg vermittelten Signaltransduktion der ganglionären Zellen. Insbesondere sollte ermittelt werden, ob es bei den einzelnen Signalwegen Unterschiede zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen gibt. Hierzu wurden die Neurone der Zellkultur mit den potentiellen Liganden Acetylcholin, NO und PACAP stimuliert. Durch Co-Stimulationen der Zellen mit Acetylcholin und NO bzw. PACAP wurde eine etwaige gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Transmittersysteme untersucht. Die Zellantworten der MOL2.3-positiven wie -negativen Zellen auf die unterschiedlichen Stimulationen mit einem oder zwei Liganden wurden quantitativ erfasst und statistisch ausgewertet.

Zunächst wurde erforscht, ob Acetylcholin, der klassische Neurotransmitter der präsynaptischen Neurone, auch in den Zellen der ganglionären Kultur ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal bewirkt. In diesem Zusammenhang wurde außerdem

untersucht, ob das Antwortverhalten der Zellen dosisabhängig ist. Grundvoraussetzung für die folgende detaillierte Charakterisierung der Acetylcholin-Rezeptoren und die Untersuchung der Interaktion des cholinergen mit dem nitrergen bzw. PACAPergen Transmittersystem war es, die Desensibilisierung der Zellen nach repetitiver Stimulation mit Acetylcholin einer konstanten Konzentration auszuschließen.

Wie bereits erwähnt, bestehen deutliche Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten zwischen dem Extra- und Intrazellulärraum einerseits, sowie zwischen dem Cytosol und verschiedenen zellulären Kompartimenten andererseits. Deshalb sollte geklärt werden, ob eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit Acetylcholin auf dem Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum, oder aus intrazellulären Speichern beruht.

Um die Acetylcholin-Rezeptoren der Zellen des SPG detaillierter zu charakterisieren, wurde mit Hilfe selektiver nicotinerger und muscarinerger Agonisten untersucht, welche funktionellen Acetylcholin-Rezeptor Subtypen in den Zellen lokalisiert sind. Spezifische Blocker definierter nicotinerger Acetylcholin-Rezeptoren sollten Hinweise auf im SPG exprimierte, funktionelle Untereinheitskombinationen dieser Rezeptoren liefern.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die ACh-induzierte Aktivierung des AChR direkt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt, oder aber indirekt über die Öffnung spannungsgesteuerter L- oder N-Typ Ca^{2+} -Kanäle.

Ein weiterer Hauptpunkt dieser Arbeit war die Klärung der Rolle des atypischen Neurotransmitters Stickstoffmonoxid bei der ganglionären Signaltransduktion der MOL2.3-positiven und -negativen Zellen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen NO-Donoren stimuliert. Auch eine gegenseitige Beeinflussung des cholinergen und des nitrergen Transmittersystems im SPG sollte untersucht werden, indem zunächst die Zellantworten auf Stimulation mit Acetylcholin und NO gemessen wurden, und anschließend eine Co-Applikation von ACh und einem NO-Donor durchgeführt wurde. Der Einfluss einer basalen Produktion von NO durch das Enzym nNOS auf die Zellantworten nach cholinergischer Stimulation wurde durch Enzym-Blockade der nNOS ermittelt.

Auch die Rolle des Neuropeptids PACAP für die Signalkaskade in den Zellen des SPG wurde untersucht. Für das PACAPerge System wurde wie für das nitrerge getestet, ob es unter Umständen mit dem cholinergen interferiert.

Weiterhin wurde die Frage nach der Existenz funktioneller Rezeptoren für die klassischen Neurotransmitter Noradrenalin und Glutamat geklärt.

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Aqua bidest Anlage Milli-Q Biocel (Millipore, D-Eschborn)

Autoklav Systec 2540 EL (Systec, D-Wettenberg)

Calcium-Messsystem (Diagnostic Instruments - Visitron Systems, D-Puchheim)
mit Visicam CCD-Kamera (12 BIT digital CCD (charge-coupled device)
Kamera),

MAC 5000 Steuereinheit (Diagnostic Instruments - Visitron Systems, D-
Puchheim),

Ludl-Filterrad (Ludl Electronic Products Ltd, New York, USA),

Mikroskop Olympus IMT-2 (Olympus Optical, D-Hamburg) und

Zellkultur-Messkammer (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Computer: IBM kompatible Pentiumrechner

Deckgläschenständer mit Wanne (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Fluoreszenzbinokular Wild M8 Z Diskus Zoom-Stereomikroskop (Wild, CH-
Heerburg)

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, D-Hamburg)

mit digitaler schwarz-weiß Kamera (Spot Insight, Diagnostic Instruments -
Visitron Systems, D-Puchheim)

und dazu gehöriger Software (Spot Insight Software, Diagnostic Instruments,
Michigan, USA)

Heißluftsterilisator ED 115/E2 (Binder GmbH, D-Tuttlingen)

Kryostat Typ HM 500 O (Microm GmbH, D-Walldorf)

pH-Meter 765 Calimatic (Kleinfeld Labortechnik, D-Hannover)

Pipetten (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 100-1000, 10-100, 2-10, 0,5-2 µl) (Eppendorf
AG, D-Hamburg)

Schlauchpumpe Minipuls-3 (Abimed Analysen Technik, D-Langenfeld)

Schüttler (Roth, D-Karlsruhe)

Sicherheits-Bunsenbrenner (Fireboy) (Technomara, D-Fernwald)

Spectrophotometer UV DU-50 (Beckmann Instruments GmbH, D-München)

Thermoblock QBT (VWR, D-Darmstadt)

Thermohygrograph (W. Lambrecht GmbH, D-Göttingen)

Tischrühr- und Heizgerät Combimag (Roth, D-Karlsruhe)

Vakuumpumpe XF 54 230 50 (Millipore, D-Eschborn)

Waage: Mettler P1210N (Mettler Toledo, D-Gießen)

Wasserbad BF 15 (Renner GmbH, D-Dannstadt)

2.1.2 Gebrauchsmaterial

Computerprogramme:

Adobe Photoshop, Version 7.0 (Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim)

Graph Pad Prism[®], Version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA-USA)

Metafluor, Version 4.5 (Diagnostic Instruments - Visitron Systems, D-Puchheim)

Metamorph, Version 5.05 (Diagnostic Instruments - Visitron Systems, D-Puchheim)

Sigmaplot, Version 8.0 (Jandel Scientific, Corte Madera, CA-USA)

Windows Microsoft Word, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

Windows Microsoft Excel, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

Exsiccator (MAGV, D-Rabenau)

Färbeküvetten für Objektträger (MAGV, D-Rabenau)

Gewebescheiden, schwarz (MAGV, D-Rabenau)

Objektträgermappen (MAGV, D-Rabenau)

Operationsbesteck (Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen)

Plexiglasplatten für Immunhistochemie (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Spatel (Roth, D-Karlsruhe)

Tierkäfige:

transparente Typ IV Polycarbonat-Käfige (38 x 59 x 18 cm / Breite x Tiefe x Höhe) (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmerdingen)

transparente Typ III Polycarbonat-Käfige (28 x 42 x 15 cm / Breite x Tiefe x Höhe) (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmerdingen)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen 15 x 15 mm (für Zellkultur) (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Deckgläschen 24 x 60 mm (für Immunhistochemie) (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Einmalkanülen Sterican[®] 0,9 x 40 mm, 20 G (Braun, D-Melsungen)

Einstreu für Tierkäfige: Altromin Animal-Bedding (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe)

Einwegspritzen (BD Plastipak, Becton-Dickinson, D-Heidelberg)

Flexiperm[®]-Mikro-12 Kammersysteme (Haereus, D-Hanau)

Hahnbank, 5-fach (für Imaging) pub Medizintechnik GmbH & Co. KG, D-Kirchseeon)
Kieselgel (Merck, D-Darmstadt)
Klingen für Aesculap-Rasiermesser (Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen)
Küvetten für Photometer, 10 x 4 x 45 mm (Sarstedt, D-Nümbrecht)
Objektträger 76 x 26 mm (Menzel GmbH, D-Braunschweig)
Parafilm® (Roth, D-Karlsruhe)
Pasteurpipetten, 230 mm (MAGV, D-Rabenau)
Petrischalen (Plastik), 94/16 mm (Sarstedt, D-Nümbrecht)
Petrischale (Glas), Ø 11 cm (MAGV, D-Rabenau)
pH-Indikatorpapier (Merck, D-Darmstadt)
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml (Eppendorf AG, D-Hamburg)
Röhrchen, steril, 15 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht)
serologische Pipetten 1, 5 und 10 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht)
Sterikan-Indikatorband (MAGV, D-Rabenau)
Teflonschläuche (Innendurchmesser 0,75 und 1,98 mm) (Kronlab, D-Sinsheim)
Tierfutter: Zucht-Diätfutter (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe)
Trockeneis (Balser, D-Lich)
Tygon®-Schläuche (für Perfusionspumpe), Größe 0.110 und 0.081 (Abimed Analysen Technik, D-Langenfeld)

2.1.4 Chemikalien

Acetylcholin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Äthanol, vergällt (Schmidt, D-Dillenburg)
Äthanol, unvergällt (Merck, D-Darmstadt)

Antikörper:

Primäre Antikörper:

Goat-anti-GFP (DPC Biermann, D-Bad Nauheim)
Goat-anti-VACHT (Chemicon, Temecula, CA, USA)
Rabbit-anti-ChAT (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)
Rabbit-anti-GFP (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)
Rabbit-anti-nNOS (Chemicon, Temecula, CA, USA)
Rabbit-anti-NSE (Polyscience, D-Eppelheim)
Rabbit-anti-PACAP (Bachem Biochemicals, D-Heidelberg)
Rabbit-anti-PGP9.5 (Ultra Clone, GB-Isle of Wight)
Rat-anti-SP (Fitzgerald Industries, Concord, MA, USA)

Sekundäre Antikörper:

Alexa® 488- donkey-anti-goat (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)

Alexa[®]488- donkey-anti-rabbit (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)
Cy3[™]- donkey-anti-rabbit (Dianova, D-Hamburg)
Cy3[™]- donkey-anti-rat (Dianova, D-Hamburg)
Bethanechol (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Calciumchlorid (CaCl₂) (Merck, D-Darmstadt)
Carbodiimid (1-äthyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl-) carbodiimid)(Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Citifluor[®] (Cityfluor LTD, GB-London)
Concanavalin A Typ V (Con A) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
ω-Conotoxin MVIIA (Alomone Labs, Jerusalem, Israel)
ω-Conotoxin MVIIC (Alomone Labs, Jerusalem, Israel)
ω-Conotoxin SVIB (Alomone Labs, Jerusalem, Israel)
DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid) (Alexis, D-Grünberg)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) (Merck, D-Darmstadt)
Dispase I (Roche Diagnostics, D-Mannheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
DMPP (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
DNase (Roche Diagnostics, D-Mannheim)
EGTA (Ethylenglykol-bis-(β-aminoethyläther)-N,N,N',N' - tetraessigsäure) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Fura-2 Acetoxymethylester (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)
D-Glukose (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Glutamat (Monosodium-Salz) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Kaliumchlorid (KCl) (Merck, D-Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Merck, D-Darmstadt)
MLA (Methyllycaconitin) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl) (Merck, D-Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) (Merck, D-Darmstadt)
Nifedipin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Nor-1 ((±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid) (Alexis, D-Grünberg)
Noradrenalin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Normal Horse Serum (NHS) (PAA Laboratories GmbH, A-Linz)
PACAP (Bachem Biochemicals GmbH, D-Heidelberg)
Paraffin (Erstarr.-P. 57-60 °C) (Merck, D-Darmstadt)
Paraformaldehyd (PFA) (Merck, D-Darmstadt)

Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)
Saccharose (Merck, D-Darmstadt)
Tissue Tek[®] (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)
Toluidinblau (Fluka Chemie AG, CH-Buchs)
Triton X-100 (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

2.2 Versuchstiere

2.2.1 *MOL2.3-IGITL Mäuse*

Als Versuchstiere wurden Tiere der transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL (Conzelmann et al. 2000) eingesetzt. Die Tiere wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Strotmann (Institut für Physiologie, Universität Stuttgart-Hohenheim) zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden in Gruppen von 2-4 Tieren in transparenten Typ IV Polycarbonat-Käfigen gehalten. Als Einstreu diente Altromin Animal-Bedding. Zucht-Diätfutter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden bei einem Licht- : Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden gehalten (Beginn der Tagphase um 7⁰⁰ Uhr). Die Umgebungstemperatur betrug 23 ± 1 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %. Temperatur sowie Luftfeuchtigkeit wurden ständig mit Hilfe eines Thermohygrographen kontrolliert und aufgezeichnet. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde täglich adspektorisch kontrolliert, ebenso das Vorhandensein von genügend Futter und frischem Trinkwasser.

Für die institutseigene Nachzucht wurden weibliche und männliche homozygote MOL2.3-IGITL Mäuse zur Paarung für die Dauer von 14 Tagen in Zweierkäfigen zusammen gehalten. Als Käfige dienten transparente Typ III Polycarbonat-Käfige. Nach der Tragzeit (19-21 Tage) wurden die neugeborenen Mäuse zunächst von den Muttertieren aufgezogen. Im Alter von 21 Tagen wurden die Mäuse nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von 2-4 Tieren in Polycarbonat-Käfige Typ IV umgesetzt.

Für die Versuche wurden Tiere im Alter von einem bis sieben Tagen, sowie adulte Tiere benutzt. Die Tiere wurden nach Abschluss aller Versuchsvorbereitungen erst unmittelbar vor Versuchsbeginn aus dem Tierstall geholt. Hierzu wurden sie in eine Styroporkiste mit Einstreu umgesetzt. Um die Zufuhr von ausreichend frischer Luft zu gewährleisten, befanden sich im Deckel der Kiste Löcher. Außerdem wurde die Styroporkiste auf eine Wärmflasche gestellt.

Vor dem Beginn der Studie wurde bei der zuständigen Tierschutzkommission angezeigt, dass eine Dekapitation von Mäusen mit anschließender Gewebeentnahme durchgeführt werden sollte (Projektnummer VI 63 – 19 c 20/15 c GI 18/2).

2.2.2 Wistar Ratten

Für einige Kontrollversuche wurden außerdem Wistar Ratten aus institutseigener Zucht benutzt. Die Tiere wurden einzeln in transparenten Typ IV Polycarbonat-Käfigen mit Altromin Animal-Bedding als Einstreu gehalten. Zucht-Diätfutter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Die Ratten wurden wie die Mäuse bei einem Licht- : Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden (Beginn der Tagphase um 7⁰⁰ Uhr), einer Umgebungstemperatur von 23 ± 1 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % gehalten.

Der Gesundheitszustand der Ratten wurde ebenfalls täglich adspektorisch kontrolliert, ebenso das ausreichende Vorhandensein von Futter und frischem Trinkwasser.

Für die institutseigene Nachzucht wurden weibliche und männliche Ratten zur Paarung für die Dauer von 14 Tagen in Zweierkäfigen zusammen gehalten. Als Käfige dienten Typ III Polycarbonat-Käfige. Bis zum Erreichen des Absatzgewichtes von 110 ± 10 g wurden die Ratten von den Muttertieren aufgezogen, anschließend wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von maximal 5 Tieren umgesetzt.

Für die Versuche wurden adulte Tiere benutzt. Die Tiere wurden nach Abschluss aller Versuchsvorbereitungen erst unmittelbar vor Versuchsbeginn aus dem Tierstall geholt.

Vor dem Beginn der Studie wurde bei der zuständigen Tierschutzkommission angezeigt, dass eine Dekapitation von Ratten mit anschließender Gewebeentnahme durchgeführt werden sollte (Projektnummer VI 63 – 19 c 20/15 c GI 18/2).

2.3 Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer

2.3.1 Lösungen für die Immunhistochemie

2.3.1.1 Phosphatpuffer (PB)

Für alle Wasch- und Inkubationsschritte des immunhistochemischen Protokolls stellte 0,1 M Phosphatpuffer die Grundlage dar.

Der Phosphatpuffer (PB) wurde aus Stocklösungen einer 0,2 M/l Dinatriumhydrogen-Phosphat (Na_2HPO_4)- und einer 0,2 M/l Natriumdihydrogen-Phosphat (NaH_2PO_4)-Lösung in *Aqua bidest* hergestellt. Die Stocklösungen konnten bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden. Durch Mischung der beiden Stocklösungen (720 ml NaH_2PO_4 und 280 ml Na_2HPO_4) wurde ein 0,2 M/l PB erhalten, welcher mit der gleichen Menge *Aqua bidest* (1 l) auf eine Molarität von

0,1 M/l verdünnt wurde. Der gewünschte pH-Wert von 7,4 wurde mit pH-Indikatorpapier kontrolliert. Der PB wurde immer direkt vor den entsprechenden Versuchen frisch angesetzt.

2.3.1.2 Präinkubationspuffer

Um das Problem der unspezifischen Hintergrundfärbung bei der Immunhistochemie zu minimieren, wurden bei den untersuchten Geweben zunächst unspezifische Bindungsstellen blockiert. Hierzu wurden die Gewebeschnitte mit dem auf PB basierenden Präinkubationspuffer inkubiert. In dem PB wurde unter vorsichtigem Rühren 10 % *normal horse serum* und 0,3 % Triton X-100 gelöst. Das *normal horse serum* maskiert die unspezifischen Bindungsstellen, während das Triton X-100 als Detergens dient.

2.3.1.3 Inkubationspuffer

Sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper, welche in der Immunhistochemie am fixierten Gewebeschnitt eingesetzt wurden, wurden in Inkubationspuffer gelöst, dessen Grundlage ebenfalls 0,1 M/l PB darstellt. Diesem wurden unter vorsichtigem Rühren 2 % *normal horse serum* und 0,1 % Triton X-100 zugegeben. Die entsprechenden Antikörper (Kapitel 2.4.1.3) wurden vorsichtig in dem Inkubationspuffer gelöst.

2.3.1.4 Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)

Für die Immunhistologie ist die Belassung des Antigens in seiner natürlichen Umgebung und in seiner natürlichen Konformation von entscheidender Bedeutung. Um dies zu gewährleisten wurde das Gewebe fixiert, um die Antigene vor der anschließenden chemischen sowie physikalischen Behandlung zu schützen. Die Wirkung des Fixationsmittels Paraformaldehyd beruht auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen.

Die PFA-Lösung wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt. Um eine 4 % PFA-Lösung zu erhalten, wurde zunächst eine entsprechende Menge Paraformaldehyd unter dem Abzug abgewogen und unter Rühren in PB gelöst. Nachdem die Lösung auf 60 °C erhitzt worden war, wurde solange gerührt bis sich das PFA vollständig gelöst hatte und die Lösung klar war. Abschließend wurde die PFA-Lösung filtriert und auf Eis auf 4 °C gekühlt.

2.3.1.5 Saccharoselösung (20 %)

Die Saccharose diente zum Auswaschen der Fixationslösung sowie zur Kryoprotektion der Gewebe, bevor diese eingefroren wurden.

Grundlage der 20 % Saccharoselösung war ebenfalls der PB. Saccharose wurde in einer entsprechenden Menge abgewogen und unter Rühren zum PB gegeben. Nach der vollständigen Auflösung der Saccharose wurde die Lösung bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.3.2 Lösungen für die Primärkultur

Für die Etablierung und Durchführung der Primärzellkultur aus dem *Ganglion sphenopalatinum* wurde ein sogenannter „Rat Ringer“ Puffer verwendet.

Dieser war folgendermaßen zusammengesetzt (in mmol/l): NaCl 138; KCl 5; CaCl₂ 1; MgCl₂ 1,5; HEPES 10; Glukose 10. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt. Im fertigen Puffer wurde *bovines Serum Albumin* (BSA) in einer Endkonzentration von 0,01 % gelöst.

2.3.3 Lösungen für die Ca²⁺-Imaging Messungen

2.3.3.1 Messpuffer

Die Zellen wurden während der Imaging-Versuche kontinuierlich mit Messpuffer superfundiert. Außerdem wurden sämtliche Agonisten und Antagonisten in diesem Puffer gelöst. Bei dem Messpuffer, welcher in den Ca²⁺-Imaging Versuchen eingesetzt wurde, handelt es sich um den oben beschriebenen Rat Ringer Puffer.

2.3.3.2 High-Kalium Puffer

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe eines Puffers mit hoher Kalium-Konzentration überprüft. Der *High-Kalium* Puffer war folgendermaßen zusammengesetzt (in mmol/l): NaCl 43; KCl 100; CaCl₂ 1; MgCl₂ 1,5; HEPES 10; Glukose 10. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt. Dem fertigen Puffer wurde *bovines Serum Albumin* in einer Endkonzentration von 0,01 % zugegeben.

2.3.3.3 *Calcium-Minimalpuffer*

In einer der durchgeführten Versuchsserien sollte geklärt werden, ob eine etwaige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Calcium aus dem Extrazellulärraum zustande kommt, oder ob das Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Hierzu wurde ein Calcium-freier Puffer benötigt, welcher folgendermaßen zusammengesetzt war (in mmol/l): NaCl 128; KCl 5; MgCl₂ 6; HEPES 10; Glukose 10; EGTA 1. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt. Dem fertigen Puffer wurde *bovines Serum Albumin* in einer Endkonzentration von 0,01 % zugegeben.

2.4 Methoden

2.4.1 Immunhistochemie

2.4.1.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie können unter Verwendung spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper (meist IgG) Varianten antigener Strukturen in Zellen und Geweben lokalisiert werden (Harlow and Lane 1988). Die Determinante des Antigens (AG), an welche der Antikörper (Ak) bindet, wird Epitop genannt (Dröbner and Gemsa 2000, Liddell and Weeks 1996).

Antikörper werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Es handelt sich um Glykoproteine, welche von Plasmazellen produziert werden. Ein Antikörper besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken so verknüpft sind, dass jede schwere Kette mit einer leichten Kette und die beiden schweren Ketten miteinander verbunden sind (Abbildung 10). Jede der vier Polypeptidketten besitzt eine variable Region an ihrem Aminoende und eine konstante Region. Durch Verdauung mit der Protease Papain kann ein Antikörpermolekül in drei gleich große Fragmente gespalten werden. Zwei identische, sogenannte F_{ab} -Fragmente (*fragment antigen binding*), welche antigenbindende Aktivität besitzen, sowie ein F_c -Fragment (*fragment crystallizable*) das sich kristallisieren lässt. Die variablen Regionen, die Teil der F_{ab} -Fragmente sind, enthalten sogenannte hypervariable Bereiche, welche für die Antigenbindung verantwortlich sind (Janeway and Travers 1997). Innerhalb der hypervariablen Bereiche gibt es einen Abschnitt, der als Paratop bezeichnet wird. Das Paratop stellt die tatsächliche Bindungsstelle dar, die an das Epitop bindet (Dröbner and Gemsa 2000). Erkennt das Paratop eines Antikörpers das entsprechende Epitop, so kommt es zur reversiblen Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes mit hoher Affinitätskonstante K_D (Janeway and Travers 1997, Janeway et al. 1999).

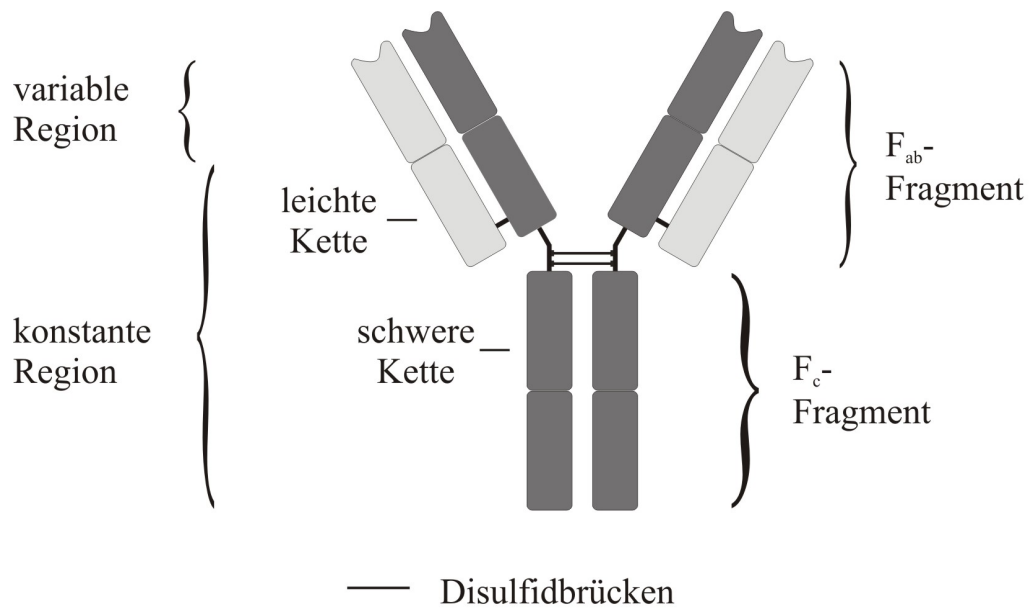


Abbildung 10 : Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls.

Jedes Antikörpermolekül besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die aminoterminalen Domänen jeder Kette sind variabel, alle anderen Domänen dagegen sind konstant. Funktionell kann man das Molekül in unterschiedliche Fragmente spalten: Zwei identische antigenbindende F_{ab} -Fragmente und ein F_c -Fragment, welches sich kristallisieren lässt

Der histologische Nachweis von Antigen-Antikörper Komplexen im Gewebe bzw. in der Zellkultur kann durch zahlreiche empfindliche Verfahren erfolgen. Man unterscheidet direkte von indirekten Markierungsverfahren, sowie unterschiedliche Arten der Markierung. Ist der primäre Antikörper, dass heißt der Antikörper, welcher gegen das nachzuweisende Epitop im Gewebe gerichtet ist, markiert, so handelt es sich um eine direkte Markierung. Bei den indirekten Markierungsverfahren ist der primäre Antikörper nicht markiert, er muss beispielsweise von einem sekundären, markierten Antikörper detektiert werden. Die indirekte Markierung hat der direkten gegenüber den Vorteil, dass eine höhere Sensitivität und eine geringere Hintergrundfärbung erreicht werden können. Weiterhin gibt es verschiedene Arten der Markierung: Man unterscheidet die Markierung mit Fluorophoren, Enzymen, Radioisotopen oder Metallionen (Liddell and Weeks 1996).

In dieser Arbeit wurde als Markierung die indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958) gewählt. Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität sowie die geringe Modifikation des Antikörpers. Außerdem sind Mehrfachmarkierungen möglich, so dass gleichzeitig verschiedene Antigene detektiert werden können. Fluoreszenzmuster können weiterhin charakteristische diagnostische Anhaltspunkte liefern. Ein Nachteil der Fluoreszenzmarkierung ist, dass Fluorophore bei Anregung

im UV-Bereich relativ schnell ausbleichen; spezielle Einbettmedien verzögern dieses Ausbleichen (Janeway and Travers 1997).

Bei der Anwendung indirekter Immunfluoreszenzverfahren detektiert im ersten Schritt ein unmarkierter, spezifischer Primärantikörper das Epitop. Das Signal liefert im zweiten Schritt ein sekundärer, gegen die F_c -Region der spezies-spezifischen Immunglobuline gerichteter Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die F_{ab} -Region des sekundären Antikörpers ist gegen die konstante F_c -Region des Primärantikörpers gerichtet (Abbildung 10; Abbildung 11) (Janeway et al. 1999, Liddell and Weeks 1996).

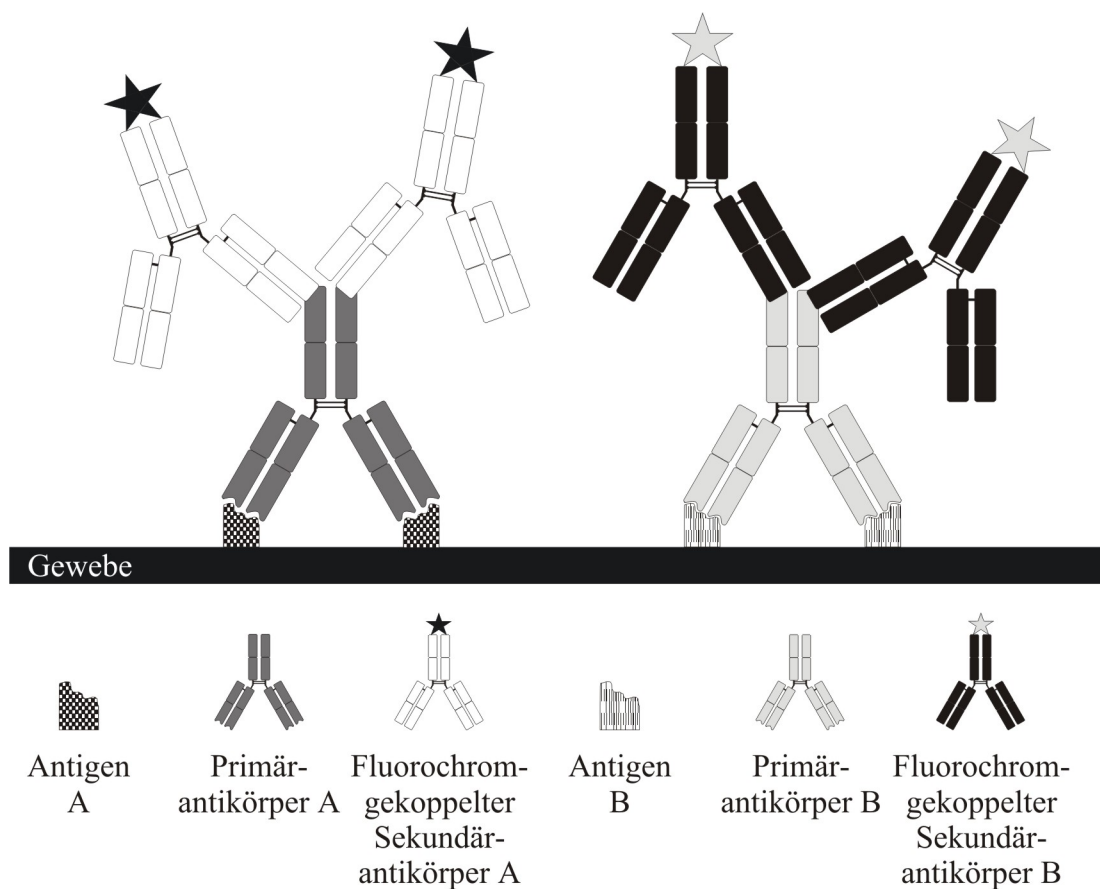


Abbildung 11: Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die primären Antikörper binden mit ihrem F_{ab} -Fragment an das Epitop des Antigens. Mit Hilfe eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher gegen das F_c -Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, kann der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden.

Die Lokalisation des Antigen-Antikörper Komplexes im Gewebeschnitt erfolgt nach geeigneter Filterwahl mit einem Fluoreszenzmikroskop. Der über den Antigen-Antikörper Komplex an das Gewebe gebundene Farbstoff wird mit Licht einer definierten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Der Farbstoff emittiert daraufhin

Licht einer für ihn charakteristischen Wellenlänge im Bereich des sichtbaren Spektrums. Durch selektive Filter sieht man im Fluoreszenzmikroskop nur Licht des verwendeten Fluorochroms.

Der gleichzeitige Einsatz mehrerer Primärantikörper aus unterschiedlichen Tierspezies und an verschiedene Fluorophore gekoppelter Sekundärantikörper ermöglicht die parallele Detektion mehrerer Antigene (Doppel- oder Dreifachmarkierung) in der zu untersuchenden Gewebestruktur (Abbildung 11) (Liddell and Weeks 1996).

2.4.1.2 Neurotransmitter-Coding mittels Immunhistochemie

Im Gegensatz zu dem 1933 von Dale postulierten Prinzip, nach dem jedes Neuron nur einen einzigen Typ von Transmitter freisetzt (Strata and Harvey 1999), ist heute bekannt, dass ein Neuron oft mehr als nur einen Botenstoff synthetisiert. Das spezifische Muster der Co-Lokalisation von Neurotransmittern stellt den neurochemischen Code eines Neurons dar. Die Immunhistochemie ist eine wichtige Methode, um den neurochemischen Code von Neuronen zu entschlüsseln, und so einen Hinweis auf die Funktion des entsprechenden Neurons zu erlangen.

Um Zellen des SPG, welche den MOL2.3-Rezeptor exprimieren, hinsichtlich ihrer Transmitterausstattung zu charakterisieren, wurden Doppelmarkierungsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz an sphenopalatinen Ganglien neugeborener MOL2.3-IGITL Mäuse durchgeführt.

Zur Identifikation der MOL2.3-Rezeptor exprimierenden Zellen wurden Primärantikörper gegen das GFP eingesetzt (Tsien 1998). Der zusätzliche Primärantikörper war jeweils gegen ein Zelltyp-spezifisches Markerprotein bzw. gegen einen Neurotransmitter / Neuromodulator gerichtet. Es wurden Antikörper gegen die neuronalen Markerenzyme Neuronen-spezifische Enolase (NSE) (Coronas et al. 2000, Day 1992, Harre et al. 2003, Schemann et al. 1995), Protein Gen-Produkt 9.5 (PGP9.5) (Day 1992), die cholinergen Marker Cholinacetyltransferase (ChAT) (Kimura et al. 1997, Schemann et al. 1993, Suzuki et al. 1990a) und den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACHT) (Gilmor et al. 1996), die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) (Edvinsson et al. 2001, Elsas et al. 1996b, Gerstberger 1999, Kimura et al. 1997, Lin et al. 1996), das *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) (Dun et al. 1996, Edvinsson et al. 2001, Elsas et al. 1996a, Nielsen et al. 1998) und das Protein Substanz P (SP) (Gibbins and Morris 1987, Lindberg et al. 1986, Lundblad et al. 1983, Matsuda et al. 1996, Rossler et al. 1993) verwendet (Tabelle 1; Tabelle 3).

2.4.1.3 Verwendete Antikörper

2.4.1.3.1 Die Primärantikörper

Für das Neurotransmitter-Coding wurden verschiedene Primärantikörper verwendet, die in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) näher beschrieben werden:

Tabelle 1 : Übersicht über die eingesetzten primären Antikörper, die von ihnen detektierten Antigene sowie ihre Herkunft und die Konzentration, in welcher der jeweilige Antikörper eingesetzt wurde

primärer Antikörper	Bezeichnung des Antigens / Marker spezifisch für	Herkunft und Konzentration des Antikörpers
anti-GFP (polyklonal, made in goat)	Green Fluorescent Protein	R1091P; DPC Biermann, D-Bad Nauheim 1:500
anti-GFP (polyklonal, made in rabbit)	Green Fluorescent Protein	A-6455; MoBiTec GmbH, D-Göttingen 1:500
anti-NSE (polyklonal, made in rabbit)	Neuron Specific Enolase → neuronale Zellen	16625; Polyscience, D-Eppelheim 1:1000
Anti-PGP9.5 (polyklonal, made in rabbit)	Protein Gene Product 9.5 → neuronale Zellen	RA95101; Ultra Clone, GB-Isle of Wight 1:500
anti-ChAT (polyklonal, made in rabbit)	Cholinacetyltransferase → cholinerge Zellen	P3Yeb; W. G. Kerckhoff- Institut, D-Bad Nauheim 1:1000
anti-VACHT (polyklonal, made in goat)	Vesikulärer Acetylcholintransporter → cholinerge Zellen	AB1578; Chemicon, Temecula, CA, USA 1:1000
anti-nNOS (polyklonal, made in rabbit)	Neuronale Stickstoffmonoxid- Synthase → nitrerge Zellen	210-501-R025; Alexis, D-Grünberg 1:1000
anti-PACAP-38 (polyklonal, made in rabbit)	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide	030354; Bachem Biochemicals, D-Heidelberg 1:1000
anti-SP (polyklonal, made in rat)	Substanz P	10-S15; Fitzgerald Industries, Concord, MA, USA 1:400

2.4.1.3.1.1 Die anti-GFP Antikörper

GFP wird bei Tieren der transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL in allen Zellen exprimiert, die das MOL2.3-Rezeptorprotein exprimieren (Conzelmann et al. 2000). Da GFP ohnehin nur schwach fluoresziert (Cubitt et al. 1995), und während der Fixation ausbleicht, wurde es in den immunhistochemischen Versuchen mittels eines Antikörpers detektiert.

Der rabbit-anti-GFP Antikörper ist gegen das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequora victoria* gerichtet (Technical Data Sheet, DPC Biermann; Tsien 1998). Zur Herstellung des goat-anti-GFP Antikörpers diente ein GST-GFP Fusionsprotein als Immunogen. Dieses ist vergleichbar mit der gesamten Aminosäuresequenz (246 Aminosäuren) des GFP, welches aus der Qualle *Aequora victoria* gewonnen werden kann (Technical Data Sheet, MoBiTec).

2.4.1.3.1.2 Der anti-NSE Antikörper

Bei der Neuronen spezifischen Enolase (NSE) handelt es sich um ein Enzym, welches ausschließlich in Neuronen und neuroendokrinem Gewebe vorkommt (Coronas et al. 2000, Day 1988, 1992, Gebke et al. 1998, Jurzak et al. 1994, Schemann et al. 1995). Die NSE unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell und immunologisch von allen anderen bekannten Enolasen. Mit einem anti-NSE Antikörper, der gegen das gamma-gamma Enolase-Isoenzym gerichtet ist, können folglich Neurone und Peptid-sezernierende neuroendokrine Zellen im SPG der Maus nachgewiesen werden (Technical Data Sheet, Polyscience) (Vinores et al. 1984).

2.4.1.3.1.3 Der anti-PGP9.5 Antikörper

PGP9.5, ein Mitglied der Ubiquitin C-Terminale Hydroxylase Familie, ist ein Neuronen-spezifisches Protein, welches sich strukturell und immunologisch von NSE unterscheidet (Thompson et al. 1983). PGP9.5 ist im Zytoplasma von Neuronen lokalisiert (Day 1992, Schemann et al. 1995). Immunhistologisch konnte PGP9.5 sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden (Thompson et al. 1983). Als Immunogen wurden die Reste 108-127 des löslichen zytoplasmatischen Proteins PGP9.5 des Menschen verwendet (Technical Data Sheet, Ultra Clone).

2.4.1.3.1.4 Der anti-ChAT Antikörper

Die Cholinacetyltransferase (ChAT) ist wie bereits erwähnt das ACh-synthetisierende Enzym (Kapitel 1.4.1) (Lodish et al. 2001, Tohyama and Takatsuji 1998). ChAT wird innerhalb des Nervensystems ausschließlich in cholinergen Neuronen exprimiert, und kann folglich zur spezifischen immunhistochemischen Darstellung cholinergischer Nervenzellen dienen (Arvidsson et al. 1997, Forth et al. 2001, Sann et al. 1995a, Sann et al. 1995b). Um den polyklonalen anti-ChAT-Antikörper herzustellen wurde als Antigen das Peptid-3 eingesetzt. Peptid-3 ist ein synthetisches Peptid, welches identisch ist mit einem Fragment des Enzyms ChAT (Schemann et al. 1993, Schemann et al. 1995).

2.4.1.3.1.5 Der anti-VACHT Antikörper

Der vesikuläre Acetylcholin Transporter (VACHT) transportiert Acetylcholin in die synaptischen Speichervesikel der neuronalen Zellen (Gilmor et al. 1996, Varoqui and Erickson 1996). VACHT ist sowohl im Zytoplasma von Neuronen lokalisiert als auch in den synaptischen Endigungen (Arvidsson et al. 1997, Parsons et al. 1993, Schafer et al. 1994, Usdin et al. 1995, Weihe et al. 1996). Der anti-VACHT Antikörper detektiert spezifisch das carboxyterminale Ende des vesikulären Acetylcholin Transporters (VACHT). Als Immunogen für die Antikörper-Herstellung diente ein synthetisches Peptid des klonierten VACHT der Ratte (Technical Data Sheet, Chemicon).

2.4.1.3.1.6 Der anti-nNOS Antikörper

Das als atypischer Neurotransmitter fungierende Molekül NO wird von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert (Kapitel 1.4.2) (Bredt et al. 1990, Bult et al. 1990, Evans et al. 1995, Knowles et al. 1989). Von den drei bekannten Isoformen der NO-Synthase war für diese Arbeit nur die neuronale NO-Synthase relevant (Alderton et al. 2001, Evans et al. 1995, Forth et al. 2001). Die nNOS findet sich im Zytoplasma und ist meist membranassoziiert. Neurone mit NO-Synthase werden als nitrerg bezeichnet. Der anti-nNOS Antikörper ist gegen die gereinigte neuronale Stickstoffmonoxid Synthase (nNOS / NOS I) aus dem Gehirn des Schweins gerichtet. Er erkennt spezifisch die nNOS und kreuzreagiert nicht mit i- oder eNOS (Technical Data Sheet, Alexis).

2.4.1.3.1.7 Der anti-PACAP Antikörper

Das Neuropeptid *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) erfüllt die Funktion eines regulatorischen Peptids (Kapitel 1.4.3) (Miyata et al. 1989, Miyata et al. 1990), und konnte in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden. Als Immunogen zu Herstellung des anti-PACAP-Antikörpers wurde folgende Antigen-Sequenz benutzt: H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂ (Technical Data Sheet, Bachem).

2.4.1.3.1.8 Der anti-SP Antikörper

Substanz P (SP) ist ein Neuropeptid, welches zur Familie der Tachykinine gehört (Forth et al. 2001). Erstmals wurde es 1931 von Euler und Gaddum im Gehirn und im Darm von Pferden entdeckt (Tohyama and Takatsuji 1998). SP ist ein Transmitter primär afferenter Neurone und kommt in 20 % der Zellkörper in den Spinal- und entsprechenden Ganglien der Hirnnerven vor, sowie in deren peripheren und zentralen Fortsätzen. Die Herstellung des Antikörpers erfolgte mit Hilfe des Immunogens Substance-P-BSA (Technical Data Sheet, Fitzgerald).

2.4.1.3.2 Die Sekundärantikörper

Um die Komplexe aus den primären Antikörpern und den entsprechenden Antigenen zu visualisieren, wurden folgende Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt (Tabelle 2):

Tabelle 2 : Übersicht über die eingesetzten Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper, ihre Herkunft sowie die eingesetzten Konzentrationen

Sekundärer Antikörper	Fluorochrom	Herkunft und Konzentration des Antikörpers
donkey-anti-goat	Alexa [®] 488	A-11055; MoBiTec GmbH, D-Göttingen 1:500
donkey-anti-rabbit	Alexa [®] 488	A-21206; MoBiTec GmbH, D-Göttingen 1:500
donkey-anti-rabbit	Cy3 [™]	711-165-152; Dianova, D-Hamburg 1:800

donkey-anti-rat	Cy3 TM	712-165-153; Dianova, D-Hamburg 1:800
-----------------	-------------------	---

2.4.1.3.3 Kombinationen der Primär- und Sekundärantikörper

Zur Detektion der unterschiedlichen Antigene wurden die primären und sekundären Antikörper in folgenden Kombinationen eingesetzt:

Tabelle 3 : Übersicht über die Kombinationen der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper zur Doppelmarkierung der verschiedenen Antigene

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Goat-anti-GFP	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Rabbit-anti-NSE	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Goat-anti-GFP	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Rabbit-anti-PGP9.5	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Goat-anti-GFP	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Rabbit-anti-ChAT	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Rabbit-anti-GFP	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Goat-anti-VACHT	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Goat-anti-GFP	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Rabbit-anti-nNOS	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Goat-anti-VACHT	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Rabbit-anti-nNOS	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Goat-anti-GFP	Alexa [®] 488-donkey-anti-goat
Rabbit-anti-PACAP	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit
Rabbit-anti-GFP	Alexa [®] 488-donkey-anti-rabbit
Rat-anti-SP	Cy3 TM -donkey-anti-rat

2.4.1.4 Versuchsdurchführung

2.4.1.4.1 Herstellung der Präparate für die immunhistochemischen Untersuchungen des Ganglion sphenopalatinum

Der Antigennachweis wurde zum größten Teil an Gewebeschnitten ganzer Köpfe transgener MOL2.3-IGITL Mäuse durchgeführt. Da es sich bei Substanz P (SP) um ein Peptid handelt, das sehr schnell aus den Neuronen abtransportiert wird, wurde der SP-Nachweis an einzeln herauspräparierten Ganglien durchgeführt.

Die neonatalen Mäuse (PN1) wurden mit einer Schere schnell dekapitiert. Danach wurden der Unterkiefer sowie die Kopfhaut abpräpariert. Zur gewebsspezifischen Fixierung wurden die Köpfe anschließend über Nacht bei 4 °C in frischer 4 % gepufferter Paraformaldehydlösung immersionsfixiert. Daraufhin wurden die Köpfe solange in 20 % Saccharose-Lösung verbracht, bis sie abgesunken waren (etwa 8 Stunden). Die Saccharose-Lösung sollte das Fixativ aus dem Gewebe verdrängen und kryoprotektiv wirken. Anschließend wurden die Köpfe in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

Zur Präparation isolierter Ganglien für den Nachweis von SP wurde das Markerprotein GFP genutzt. Nach rascher Dekapitation mittels Scherenschlag wurde die Kopfhaut der Tiere dorsal mit einem Skalpell durchtrennt, so dass das Septum deutlich zu sehen war. So war es möglich, den Kopf mit einer Einweg-Mikrotomklinge genau in der Medianen zu spalten. Die beiden Kopfhälften wurden mit je zwei gebogenen Kanülen auf einer mit Wachs gefüllten Petrischale fixiert. Nach Benetzung der Schnittflächen mit *Rat Ringer* Puffer wurde unter einem Fluoreszenzbinokular zunächst bei Durchlicht die Region der *Fossa pterygopalatina*, in welcher sich das *Ganglion sphenopalatinum* befindet, aufgesucht. Anschließend konnte das GFP in den ganglionären Zellen durch Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge (GFP plus-Filter; ARW 480 nm, EWL 510 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Ganglion konnte somit eindeutig identifiziert und mit Hilfe zweier mikrochirurgischer Pinzetten herauspräpariert werden. Jedes einzelne Ganglion wurde unmittelbar nach der Präparation 60 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) mit 4 % PFA-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PB erfolgte die Kryoprotektion mit 20 % Saccharoselösung für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer. Zum Einfrieren wurden die Ganglien einzeln auf Parafilm gelegt, mit einem Tropfen Tissue Tek[®] bedeckt und im Kryostaten bei –20 °C eingefroren. Die tiefgefrorenen Ganglien wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

In einem Kryostaten wurden bei –21 °C Kammertemperatur und –23 °C Objekttemperatur 10 µm dicke serielle Gefrierschnitte der Köpfe sowie der einzelnen Ganglien angefertigt und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgenommen. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation in einer 10 % Poly-L-Lysin Lösung bei RT mit nachfolgender Trocknung im Wärmeschrank (42 °C). Die Objektträger mit den anheftenden Gewebeschnitten wurden über Nacht in einem Exsiccator mit Kieselgel bei 4 °C getrocknet und danach bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

2.4.1.4.2 *Immunhistochemisches Protokoll*

Zum immunhistochemischen Nachweis der verschiedenen Antigene wurden die Objektträger mit den anhaftenden Gefrierschnitten zunächst in Färbeküvetten dreimal für je 5 Minuten in Phosphatpuffer rehydriert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte anschließend eine Inkubation für 60 Minuten bei RT in Präinkubationspuffer. Wie die Präinkubation, so wurde auch die nachfolgende Inkubation mit den primären polyklonalen Antikörpern (Tabelle 1; Tabelle 3) mittels Plattentechnik durchgeführt. Die Objektträger mit den anhaftenden Gewebeschnitten wurden dabei „*upside-down*“ auf Plexiglasplatten mit beidseitig erhöhten Kanten (125 µm) gelegt. Zwischen Gewebeschnitt und Platte bildete sich ein schmaler Spalt, welcher mittels kapillarer Kräfte gleichmäßig mit je 200 µl serumhaltiger Pufferlösung (Inkubationspuffer mit entsprechenden Antikörperseren) gefüllt werden konnte. Diese Methode minimiert die Austrocknungsgefahr der Schnitte während der Inkubation. Um sicher zu stellen, dass keine Austrocknungsartefakte auftreten, wurden die Plexiglasplatten mit den Objektträgern zusätzlich in einer Instrumentendose aus rostfreiem Stahl mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre aufbewahrt (4 °C; 24 h).

Um überschüssige, ungebundene primäre Antikörper zu entfernen, wurden die Objektträger im Anschluss an die Primärinkubation dreimal für je 5 Minuten mit Phosphatpuffer in Küvetten gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (Tabelle 2; Tabelle 3) in Inkubationspuffer für 2 Stunden bei RT unter Lichtausschluss. Nach abschließendem, dreimaligen Waschen in Phosphatpuffer für je 5 Minuten wurden die Objektträger mit den anhaftenden Schnitten mit Deckgläschen in Citifluor® gedeckelt.

2.4.1.5 *Negativkontrollen*

2.4.1.5.1 *Nachweis der Spezifität der Primärantikörper*

Zum Nachweis der Spezifität der eingesetzten primären Antikörper wurden diese zunächst an Geweben der Ratte getestet, von welchen aus der Literatur bekannt war, dass das nachzuweisende Antigen hier exprimiert wird. In nachfolgenden Versuchen wurden dieselben Antikörper an den entsprechenden Geweben der MOL2.3-IGITL Maus getestet.

2.4.1.5.1.1 Präparation der Gewebe

Die für die Kontrollversuche eingesetzten Ratten und Mäuse wurden mit CO₂ betäubt und anschließend dekapitiert. Als Kontrollgewebe wurden Hinterwurzelganglien, Rückenmark, Stammhirn (aus dem Bereich der *Area postrema*) sowie Hypothalamus präpariert.

Um Hinterwurzelganglien isolieren zu können, wurde die Haut direkt über der Wirbelsäule mit einem Skalpell durchtrennt. Haut und Muskulatur wurden abpräpariert und der Wirbelkanal eröffnet, so dass die Hinterwurzelganglien sichtbar waren. Die Ganglien konnten mittels einer Pinzette und Augenschere vom umgebenden Gewebe abgelöst werden.

Zur Gewinnung des Rückenmarks wurde der knöcherne Teil der Wirbelsäule dorsal mit einer Hohlmeisselzange aufgebrochen. Unter Durchtrennung der afferenten und efferente Nerven mittels Schere konnte das Rückenmark aus dem Wirbelkanal isoliert werden.

Um Gewebe aus dem Hypothalamus und dem Stammhirn der Tiere isolieren zu können, mussten zunächst die Kopfhaut und -muskulatur vom Schädel abgelöst werden. Die Schädelknochen wurden mit einer Hohlmeisselzange aufgeschnitten, so dass das Gehirn frei lag und aus der Schädelhöhle entnommen werden konnte. Die Regionen des Hypothalamus sowie des Stammhirns wurden mit einem Skalpell vom restlichen Gehirn abgetrennt.

Die isolierten Gewebe wurden im Anschluss an die Präparation in 4 % PFA-Lösung über Nacht bei 4 °C immersionsfixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gewebe bis zum Absinken in 20 % Saccharose-Lösung gelagert (4 °C).

Die Präparate wurden im Kryostaten bei –20 °C in Tissue Tek[®] eingefroren. Die Anfertigung der Gewebeschnitte erfolgte auf die oben beschriebene Weise (Kapitel 2.4.1.4.1), mit dem Unterschied, dass die Schnittdicke 20 µm betrug.

2.4.1.5.1.2 Immunhistochemisches Protokoll

Das verwendete Versuchsprotokoll für die Negativkontrollen entspricht dem, welches für die Doppelmarkierungsstudien eingesetzt wurde (Kapitel 2.4.1.4.2). Da allerdings nur jeweils ein Antigen detektiert werden sollte, wurde nur je ein Primär- und Sekundärantikörper eingesetzt.

2.4.1.5.2 Nachweis der Spezifität der Sekundärantikörper

Um die Spezifität der sekundären Antikörper nachzuweisen, wurden in jedem immunhistologischen Experiment bei zwei Objektträgern dem Inkubationspuffer

keine primären Antikörper zugesetzt. Die Präinkubation und die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgten wie oben beschrieben.

2.4.1.6 Auswertung

Da Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet wurden, erfolgte die Auswertung der Gewebeschnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Um die Lokalisation der Alexa488[®]-markierten Antigen-Antikörper-Komplexe bzw. Strukturen zu visualisieren, wurde ein FITC-Filter (ARW 450-490 nm) benutzt, während Cy3[™]-gekoppelte Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen Rhodamin-Filter (ARW 510-530 nm) betrachtet wurden. Alexa488[®] emittiert grünes Licht einer Wellenlänge von 510-530 nm, Cy3[™] rotes Licht einer Wellenlänge von 630-660 nm. Zur gleichzeitigen Lokalisation zweier markierter (Alexa488[®] und Cy3[™]) Antigene wurde ein Doppelfilter benutzt. Die Gewebeschnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Mittels einer digitalen schwarz-weiß Restlicht-Kamera und dazu gehöriger Software wurden digitale Bilder der immunhistologischen Schnitte erstellt und mit der Software Metamorph dokumentiert und bearbeitet. Die Helligkeit sowie der Kontrast der Bilder wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop angepasst. Mit derselben Software wurden die einzelnen Bilder zu Bildtafeln zusammengestellt.

Um quantitative Aussagen machen zu können, wurden die immunreaktiven Zellen gezählt. Hierfür wurde bei der Fluoreszenzmikroskopie ein Objektiv mit integriertem Koordinatensystem (10 x 10 Felder) benutzt.

Für jede Versuchsserie wurde die Immunhistologie an 5 Tieren durchgeführt. Von jedem der 5 Tiere wurden 10 Gewebeschnitte ausgewählt, welche gleichmäßig durch das Ganglion verteilt waren. In diesen 10 Schnitten wurden die immunreaktiven Zellen in abwechselnd 5 rechten und 5 linken Ganglien ausgezählt. Es wurden zunächst alle grün markierten Zellen gezählt, danach die rot gefärbten und zum Schluss die doppelt markierten Zellen. Da VACHT nicht nur in den Perikarya der Neuronen lokalisiert ist, sondern auch in deren synaptischen Endigungen, konnte zusätzlich ermittelt werden, wie viele Zellen von Axonendigungen VACHT-immunreaktiver Zellen kontaktiert wurden. Die ermittelten Zellzahlen wurden in ein Koordinatensystem mit 10 x 10 Feldern eingetragen und anschließend zur Auswertung und graphischen Darstellung in das Programm Graph Pad Prism[®] eingegeben.

2.4.2 *Primäre Zellkultur des Ganglion sphenopalatinum der transgenen MOL2.3-IGITL Maus*

2.4.2.1 Grundlagen der Zellkultur

Die Zellkultur ist definiert als das *in vitro*-Wachstum von Zellen, welche aus dem elterlichen Gewebe nach spontaner Auswanderung oder durch mechanische oder enzymatische Vereinzelung gewonnen wurden (Freshney 1990).

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts machte man sich Gewebekulturen zunutze, um das Verhalten von Zellen zu studieren (Freshney 1990). Heute stellt die Zellkultur eine unabkömmliche Möglichkeit dar, einzelne Zellen im Hinblick auf ihre Morphologie sowie ihre biochemischen, pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften zu untersuchen (Gebke et al. 1998, Gebke et al. 2000, Jurzak et al. 1995a, Jurzak et al. 1994). Man unterscheidet etablierte Zelllinien von Primärkulturen. Primärkulturen sind Zell-, Gewebe- oder Organkulturen nach ihrer Entnahme aus dem Organismus und vor der ersten Passage. Als Zelllinien dagegen werden Zellkulturen nach der ersten Passage bezeichnet. Passage meint den Transfer von Zellen von einem Kulturgefäß in ein anders (Freshney 1990). Es ist davon auszugehen, dass Zellen aus Primärkulturen dem entsprechenden *in vivo*-Zelltyp mehr ähneln als Zellen aus Zelllinien (Morgan and Darling 1994).

Nach der Isolation des gewünschten Gewebes aus dem Organismus müssen dessen Zellen enzymatisch und/oder mechanisch aus dem Gewebeverband gelöst werden. In dieser Studie wurden die Ganglien zunächst enzymatisch dissoziiert, um die interzellulären Verbindungen zwischen den Zellen zu lösen. Zu diesem Zweck wurde die Protease Dispase I gewählt. Aufgrund seiner milden proteolytischen Eigenschaften löst dieses Enzym das Gewebe zwar nur unvollständig auf, bewirkt allerdings auch keine nennenswerte Schädigung der Zellmembranen (Cruz et al. 1997, Frangakis and Kimelberg 1984, Frangakis et al. 1982, Gebke et al. 1998, Gebke et al. 2000). Eine Protease mit höherer Enzymaktivität würde zur irreversiblen Schädigung der Zellmembranen bzw. ihrer intrinsischen Proteine führen, was die Ausbeute kultivierungsfähiger Zellen deutlich vermindern würde. Da die späteren funktionellen Untersuchungen der kultivierten Zellen auf Einzelzellniveau erfolgen sollten, mussten die Zellen allerdings vollständig aus dem Gewebeverband gelöst werden. Aus diesem Grund folgte der enzymatischen Dissoziation eine zusätzliche mechanische, um die noch vorhandenen Zell-zu-Zell Kontakte zu zerstören (Gebke et al. 1998, Gebke et al. 2000, Jurzak et al. 1994). Sowohl bei der enzymatischen als auch bei der mechanischen Dissoziation wird immer ein gewisser Teil der Zellen lysiert, so dass aus ihnen DNA freigesetzt wird. Da DNA die Proteolyse beeinträchtigt und die Reaggregation der Zellen fördert, wurde sie mit Hilfe des Enzyms DNase hydrolysiert (Freshney 1990).

2.4.2.2 Montage und Beschichtung der Zellkulturkammern

Da es sich beim *Ganglion sphenopalatinum* um eine sehr kleine neurogiale Struktur handelt, mussten die Zellkulturkammern, in denen die Zellen kultiviert wurden, eine möglichst kleine Grundfläche haben (Jurzak et al. 1994). Hierzu wurden wiederverwendbare Flexiperm[®]-Mikro-12 Kammersysteme in jeweils sechs separierte Mikrokammern aufgeteilt (Grundfläche 28 mm²). Da Glas eine für die Anheftung und das Wachstum von Zellen geeignete Oberfläche incl. deren elektrischer Ladung trägt, wurden als Kammerboden, und somit auch Adhäsionsmatrix, Deckgläschen benutzt. Ein weiteres Argument für Glas als Substrat für die Zellen sind die optischen Eigenschaften des Glases (Freshney 1990). Um die Ratio-Imaging Studien zur Messung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durchführen zu können, muss die Adhäsionsmatrix der Zellen eine hohe Durchlässigkeit für monochromatisches Licht entsprechender Wellenlänge bei vernachlässigbarer optischer und chromatischer Abberation haben.

Die Deckgläschen wurden auf die Unterseite der Flexiperm[®]-Mikrokammern gelegt, wo sie sich fest anhefteten. In den so vorbereiteten Kammern wurden die Deckgläschen für 2-3 Minuten mit jeweils 70 µl Carbodiimid (1-äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl-) carbodiimid (Cyanamid), 75 mg/ml) in *Rat Ringer* Puffer behandelt. Nachdem das Carbodiimid mit einer Pipette abgesaugt worden war, erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde mit Concanavalin A Typ V (Con A, 10-15 mg/ml) in *Rat Ringer* Puffer. Danach wurden die Kammern drei mal mit Puffer gewaschen. Die so mittels Carbodiimid quervernetzten, Con A-beschichteten Kammern konnten mit Puffer bedeckt in einer mit Parafilm[®] abgedichteten Petrischale bei 4°C aufbewahrt werden.

2.4.2.3 Präparation des *Ganglion sphenopalatinum*

Die Präparation des *Ganglion sphenopalatinum* erfolgte unter semisterilen Bedingungen; es wurden hitze- oder äthanolsterilisierte Instrumente und Materialien benutzt.

Für die Zellkultur wurden 2–7 Tage alte Tiere der transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL verwendet. Die Präparation der einzelnen Ganglien erfolgte nach demselben Protokoll wie bei der Immunhistochemie zum Nachweis von SP (Kapitel 2.4.1.4).

Die Ganglien aller in den Versuch eingesetzten Tiere wurden in eiskaltem *Rat Ringer* Puffer in einer Gewebeschale gesammelt. Um eine ausreichende Zelldichte zu erhalten, wurden unmittelbar nacheinander die Ganglien von drei neugeborenen MOL2.3-IGITL Mäusen präpariert.

2.4.2.4 Weiterverarbeitung des Gewebes

Die vereinigten Ganglien aller Tiere wurden mittels einer feuerpolierten Pasteurpipette aus der Gewebeschale in ein 15 ml Röhrchen transferiert. Nach Zugabe von 2 ml Dispase I-Lösung (0,7 U/ml) folgte eine Inkubation für 45 Minuten im Thermoblock bei 37°C. Im Anschluss an die enzymatische Dissoziation wurde durch dreimaliges Waschen mit vorgewärmtem *Rat Ringer* Puffer die Dispase I-Lösung entfernt. Das Gewebe wurde in 1 ml *Rat Ringer* Puffer, dem 5 µl DNase (2 U/µl) zugesetzt wurden, aufgenommen und einer mechanischen Dissoziation unterzogen. Hierzu wurden die Gewebsfragmente solange durch die feuerpolierte Öffnung einer Pasteurpipette gesogen, bis das Gewebe nahezu vollständig dissoziiert war. Als Anhaltspunkt für den Grad der Dissoziation wurden das Fehlen sichtbarer Gewebefragmente sowie eine milchige Trübung der Lösung gewählt. Während der mechanischen Behandlung wurde darauf geachtet, dass keine gewebsschädigenden Luftblasen entstehen (Chad et al. 1991).

Abschließend wurde die Zellsuspension auf die Kulturkammern verteilt (200 µl/Kammer). Die Kammern wurden in einer Petrischale 1 Stunde bei RT im Dunkeln stehen gelassen, damit die Zellen am Deckgläschen adhärieren konnten. Wenn die Zellen nach ausreichender Kultivierungszeit an den Deckgläschen angeheftet waren, konnten die Kammerwände entfernt werden. Danach standen die auf den Deckgläschen adhärerten Zellen für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung.

2.4.3 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Ratio-Imaging Technik

2.4.3.1 Grundlagen der Ratio-Imaging Technik

Die Ratio-Imaging Technik bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen ($[Ca^{2+}]_{iz}$) kontinuierlich zu messen (Baylor and Hollingworth 2000, Hinman and Sammak 1998). Damit stellt die Methode eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der transmitterinduzierten, intrazellulären Signaltransduktion in lebenden Zellen wie Neuronen oder Astrozyten dar (Gebke et al. 2000, Jurzak et al. 1995a).

Um Änderungen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ messen zu können, macht man sich selektive, Ca^{2+} -chelierende Fluoreszenzfarbstoffe zunutze (Moreton 1994). Die Entwicklung der ersten Farbstoffe dieser Gruppe gelang Roger Tsien (Tsien 1980). Das Äquorin der Leuchtqualle war der erste, wissenschaftlich in der Muskelforschung eingesetzten Calciumindikator zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration. Heute steht eine große Anzahl selektiver Fluoreszenzindikatoren zur Calcium-Messung zur Verfügung, wie beispielsweise Derivate des Calciumchelators EGTA (z.B. Quin-2, Indo-1, Fura-2), des Fluoresceins (z.B. Fluo-3) oder des Rhodamins (z.B. Rhod-2) (Grynkiewicz et al. 1985).

Die Farbstoffe werden in zwei große Gruppen unterteilt: Die Wellenlängen-stabilen (*wavelength stable*) und die Wellenlängen-ändernden (*wavelength shifting*) Fluoreszenzfarbstoffe. Bei den Wellenlängen-stabilen Fluoreszenzindikatoren, wie z.B. Quin-2, ändert sich durch Calciumbindung nur die Emissionsintensität, das Exzitationsspektrum aber bleibt konstant. Mitglieder der Gruppe der Wellenlängen-ändernden Farbstoffe ändern nach Calciumbindung entweder ihre Exzitations- oder ihre Emissionsspektren (Moreton 1994, Ross 1989, Thomas and Delaville 1991, Tsien 1980, 1989, Tsien and Poenie 1986) und erwiesen sich deshalb als besonders geeignet für die intrazelluläre Calcium-Konzentrationsmessung. Zu den Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikatoren gehört auch das in dieser Arbeit eingesetzte Fura-2 (Abbildung 13), dessen Exzitationsspektrum sich nach Calciumbindung ändert (Roe et al. 1990, Tsien and Poenie 1986, Tsien et al. 1985). Das Anregungsoptimum des freien, polyanionischen Indikators Fura-2 liegt bei 363 nm, der mit Calcium gesättigte Farbstoff dagegen wird maximal durch Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt. Das Emissionsmaximum bleibt mit etwa 510 nm konstant (calciumfreies Fura-2 512 nm, calciumbindendes Fura-2 505 nm) (Abbildung 12) (Thomas and Delaville 1991, Tsien and Poenie 1986). In der Praxis wird zur Messung der Fluoreszenzintensität des Calcium-freien Farbstoffes

allerdings nicht die optimalen Anregungswellenlängen von 363 nm benutzt, sondern Licht einer Wellenlänge von 380 nm. Der Grund hierfür ist, dass eine Wellenlänge von 363 nm sehr nah am sogenannten isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Spektralverhaltens liegt, bei dem die Fluoreszenzintensität des Fura-2 unabhängig von der Calciumkonzentration immer gleich ist (Abbildung 12). Bei einer (Anregungswellenlänge) ARW von 380 nm ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für Calcium-freies und –gesättigtes Fura-2 am größten.

Bei der Ratio-Imaging Technik wird der Quotient (Ratio) aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden ARW 340 und 380 nm gemessen. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wider (Tsien et al. 1985).

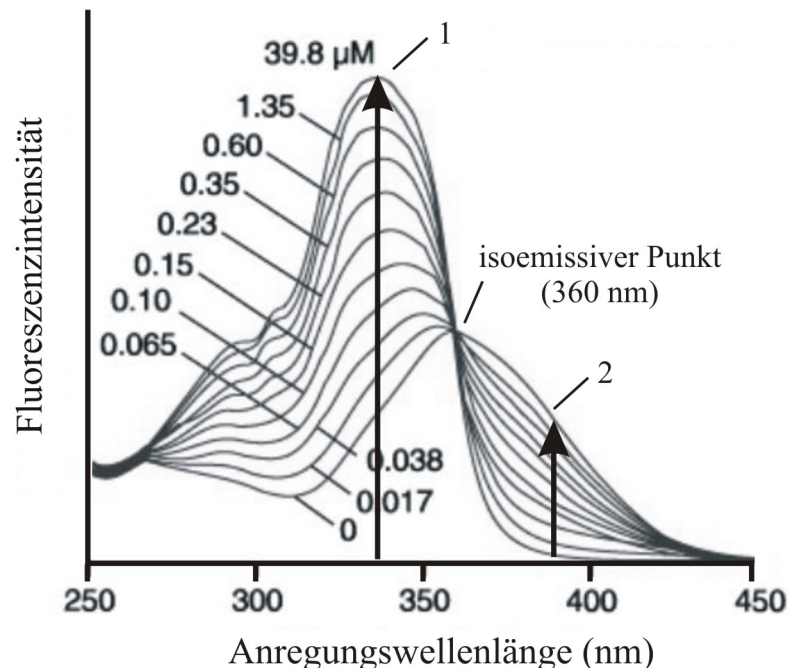


Abbildung 12 : Exzitationsspektren von Fura-2

Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge 510 nm) von Fura-2 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an freien Calciumionen ($[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ (µM)).

Kurve 1: das gesamte Fura-2 ist mit Calcium gesättigt; Maximum bei 340 nm

Kurve 2: das gesamte Fura-2 liegt Calcium-frei vor; Maximum bei 363 nm

Die Pfeile zeigen die Fluoreszenzintensitäten bei den beiden in der Praxis des Ratio-Imagings benutzten Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm. Hier ist jeweils die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca^{2+} -freies und –gesättigtes Fura-2 am größten.

Der Vorteil des Einsatzes der Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikatoren gegenüber den Wellenlängen-stabilen liegt in der Möglichkeit zur Ratiobildung (Roe et al. 1990). Imaging-Versuche werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Bei der Ratiomessung wirken sich viele dieser Faktoren im gleichen Maß auf beide Anregungswellenlängen aus, sie werden dann bei der Quotientenbildung herausgekürzt. Die Messungen werden so unabhängig von der intrazellulär vorhandenen Menge an Indikatorsubstanz, einer eventuell ungleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs sowie der Zelldicke und einem Ausbleichen („*photo bleaching*“) oder Austreten des Farbstoffes (Roe et al. 1990, Tsien and Poenie 1986, Tsien et al. 1985).

Gemäß des Massenwirkungsgesetzes verhält sich die Ratio proportional zur Konzentration des vorhandenen freien bzw. gebundenen Calciums. Aus der im Versuch gemessenen Ratio (Emission (340 nm) / Emission (380 nm)) kann mit Hilfe folgender Gleichung die absolute, intrazelluläre Calciumkonzentration errechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985):

$$[Ca^{2+}] = KD \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Formellegende:

KD = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Calcium

R = gemessene Ratio (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW)

R_{min} = Ratio bei calciumfreiem Fura-2

R_{max} = Ratio bei calciumgesättigtem Fura-2

S_{f2} = Emissionswerte des calciumfreien Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

S_{b2} = Emissionswerte des calciumgesättigten Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

In dieser Arbeit wurde aus den gemessenen Ratios allerdings nicht die Ca²⁺-Konzentration errechnet, da es ausreichte, die Ratioänderung als Zeichen einer Reaktion heranzuziehen.

Bei Fura-2 handelt es sich um ein stark negativ geladenes Molekül, welches nicht in der Lage ist, Zellmembranen zu permeieren. Um eine Farbstoffbeladung der zu untersuchenden Zellen ohne Schädigung der Zellmembran zu ermöglichen, wurden Acetoxymethylesterderivate der Fluoreszenzindikatoren entwickelt. Diese sind lipophil und somit membranpermeabel, können allerdings keine Calciumionen binden. In der Zelle wird der Fura-2 Acetoxymethylester durch zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. Da das Fura-2 Molekül nun membranimpermeabel ist, ist der

Farbstoff in der Zelle „gefangen“ (Tsien and Poenie 1986). Außerdem kann nur das aktive Fura-2 Molekül zweiwertige Kationen, vor allem freies Ca^{2+} binden.

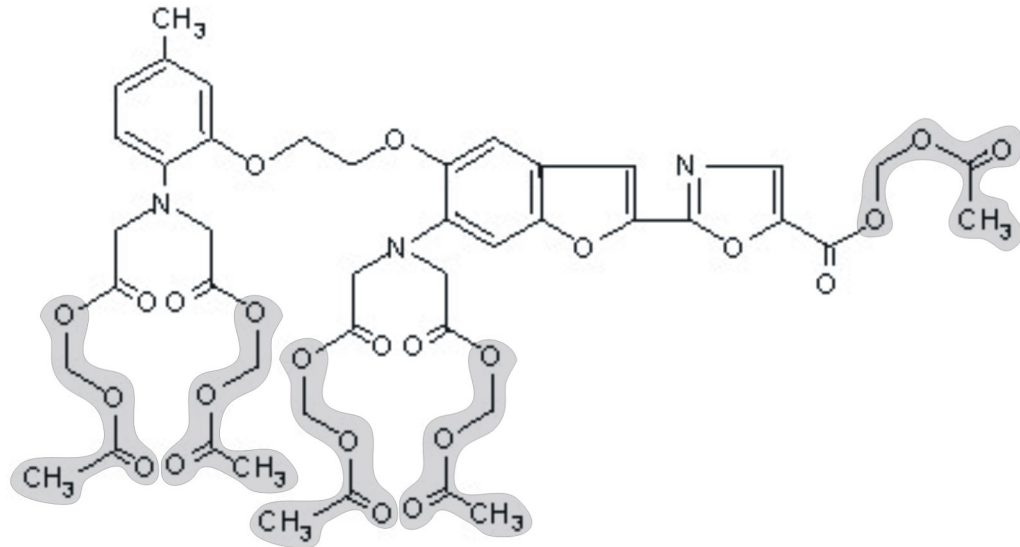


Abbildung 13 : Strukturformel des Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM)

Die grau hinterlegten Bereiche des Moleküls werden in der Zelle durch zytoplasmatische Esterasen abgespalten. Fura-2 wird so membranimpermeabel, und kann außerdem als aktive Form Ionen binden.

2.4.3.2 Der Einsatz von Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester in der Primärkultur

Um die calciumabhängige Signaltransduktion in isolierten Neuronen des *Ganglion sphenopalatinum* zu untersuchen, wurde als Indikatorfarbstoff Fura-2 gewählt. So konnten etwaige Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{iz}$) nach externer Stimulation mit verschiedenen Neurotransmittern und Neuromodulatoren sowie Rezeptor- und Calcium-Kanal Blockern gemessen werden.

Um die zu untersuchenden Zellen der Primärkultur mit Fura-2 zu beladen, wurde die Zellkulturkammer mit Messpuffer gefüllt, welcher 2 μM Fura-2 AM enthielt (Fura-2 AM in Dimethylsulfoxid (DMSO); 1 mM Stammlösung bei -24°C gelagert). Während der 45-minütigen Inkubation bei RT unter Ausschluss von Licht erfolgte die zelluläre Aufnahme des Indikators. Im Anschluss an die Inkubation wurde durch dreimaliges Waschen mit Messpuffer überschüssiger Fura-2 AM aus der Kammer entfernt. Um das Deckgläschen mit den adhärenierten Zellen in die Messkammer einzuspannen, wurde zunächst die Flexiperm-Kammerwandung entfernt. Das Deckgläschen wurde auf die mittige Öffnung einer runden Stahlscheibe gelegt, welche die Basis der Messkammer bildete (Abbildung 14). Zur Befestigung des Deckgläschens wurde ein Teflonring, der gleichzeitig die Außenwand der

Messkammer bildete, mit vier Schrauben auf der Scheibe fixiert. Die Messkammer konnte nun in eine hierfür vorgesehene Öffnung des Objektisches des Mikroskops eingesetzt werden. Nach Montage der Messkammer wurde diese sofort mit 900 µl Messpuffer gefüllt (RT). An die Messkammer wurden Zu- und Abfluss einer Schlauchpumpe in Form von gebogenen Kanülen angeschlossen. Die Kanüle, über die der Messpuffer in die Kammer geleitet wurde, reichte bis zum Boden der Kammer, während die Abflusskanüle lediglich die Flüssigkeitsoberfläche berührte. Mit Hilfe der Schlauchpumpe wurde Messpuffer mit einer Flussrate von 2 ml/min aus einem Reservoir durch die Messkammer geleitet. So konnten eine konstante Füllung der Messkammer und ein kontinuierlicher Pufferwechsel bei minimaler Turbulenz gewährleistet werden.

Die Zellen wurden nun für 10 Minuten kontinuierlich mit Messpuffer superfundiert, damit der in die Zellen aufgenommenen Fura-2 AM vollständig hydrolysiert werden konnte.

2.4.3.3 Der Imaging-Messstand

Da der eingesetzte Fluoreszenzindikator Fura-2 durch Calciumbindung sein Exzitationsspektrum ändert, wurde monochromatisches Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm benötigt. Dieses Licht wurde erzeugt, indem das Licht einer 100 Watt Quecksilberlampe abwechselnd durch zwei unterschiedliche Filter eines rotierenden Filterrades strahlte (Abbildung 14). Mit Hilfe des von einer Steuereinheit regulierten Shutters wurden die Zellen vor Hitze und *photo bleaching* geschützt. Über die Kamera konnten die Belichtungszeit sowie die zeitlichen Abstände zwischen den Belichtungen reguliert werden. Das aus dem Filterrad austretende Licht der entsprechenden Anregungswellenlängen wurde in ein inverses Fluoreszenzmikroskop geleitet. Im Mikroskop wurde das Licht an einem dichromatischen Spiegel abgelenkt und durch ein Fluoreszenzobjektiv (Vergrößerungsfaktor 30x) in die Messkammer geleitet, wo es das Fura-2 zur Fluoreszenz anregte. Das vom Fura-2 emittierte Licht gelangte von der Messkammer aus wieder durch das Objektiv, durch einen Sperrfilter (515 nm) und über den dichromatischen Spiegel in eine CCD-Restlichtkamera.

Die bei den beiden unterschiedlichen Anregungswellenlängen (340 und 380 nm) dokumentierten Bilder wurden mit Hilfe der systemeigenen Software vermessen, und aus den daraus resultierenden Werten die Quotienten (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW) gebildet, welche im Folgenden als Ratio angegeben werden.

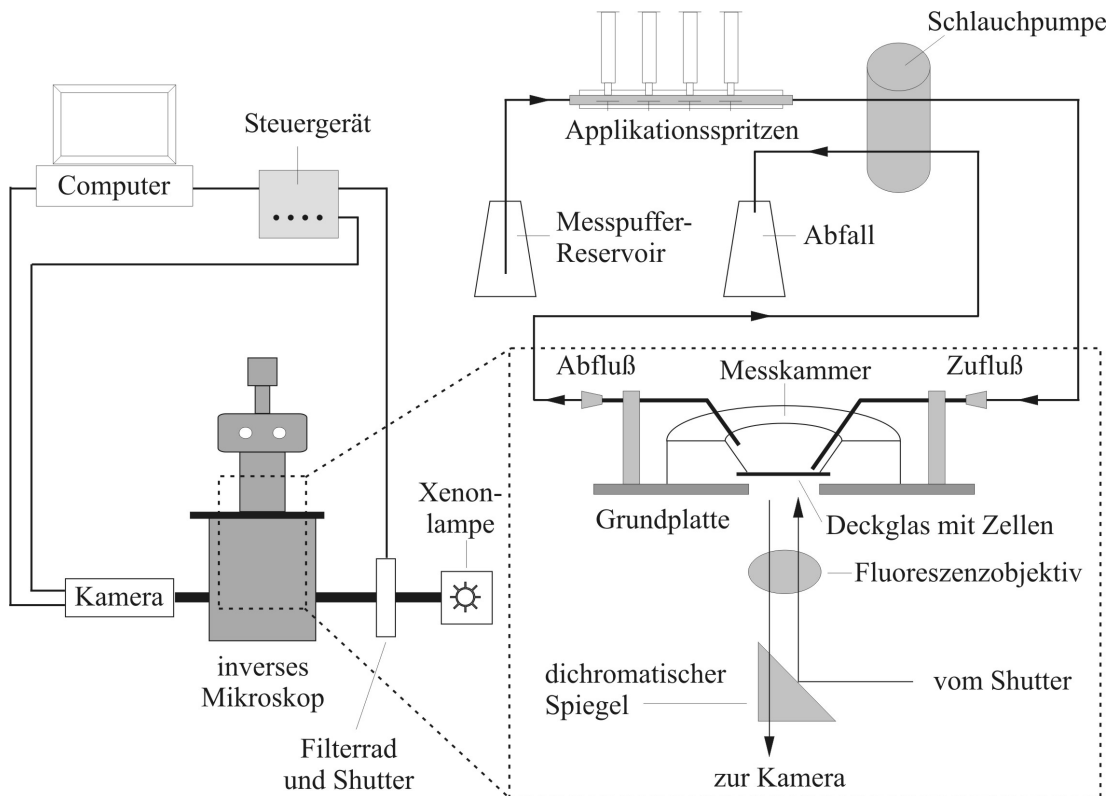


Abbildung 14 : Schematische Darstellung des Imaging-Messstandes

2.4.3.4 Messprotokolle

Jede Versuchsreihe wurde an Zellen aus mehreren Präparationen durchgeführt. Damit sollte erreicht werden, dass jeweils Zellen von unterschiedlich alten Tieren aus verschiedenen Würfen untersucht werden, um individuelle Unterschiede auszugleichen.

Mit Hilfe des Durchlichtbildes und des GFP-Filters (EGFP; ARW 488 nm, EWL 510 nm) wurden Zellen für die Messung ausgewählt, während mit Hilfe der Imaging-Filter (ARW 340 und 380 nm) die erfolgreiche Beladung kontrolliert wurde. Die jeweiligen Messungen erfolgten wie die vorausgegangenen Schritte bei RT. Die zur Stimulation bzw. Blockade verwendeten Substanzen wurden als Aliquots bei -20°C gelagert und erst unmittelbar vor der Messung aufgetaut. Je nach Konzentration der eingefrorenen Stocklösungen und gewünschter Endkonzentration der Substanzen wurden erstere mit Messpuffer (Kapitel 2.3.3.1) entsprechend vorverdünnt. Durch diese Vorverdünnung wurde auch gewährleistet, dass die Konzentration des Lösungsmittels, sofern dies nicht der *Rat Ringer* Puffer war, weniger als 1 % betrug. Die Applikation der Substanzen erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen: In den meisten Fällen wurde der jeweilige substanzhaltige Puffer in eine 10 ml Spritze pipettiert, welche über ein Schlauchsystem mit der Messkammer in Verbindung stand (Abbildung 14). Durch Umschalten der

entsprechenden 3-Wege-Hähne einer Hahnbank wurde von Messpuffer auf substanzhaltigen Puffer umgeschaltet und dieser in die Kammer geleitet. Bei Verwendung von Substanzen, die sich bei Kontakt mit Licht, Sauerstoff oder Wärme sehr leicht zersetzen, wurde auf die Applikation über das Schlauchsystem verzichtet. Hier wurden je 100 µl der Testlösungen vorsichtig als Bolus in die Messkammer pipettiert. Durch dreimaliges Aufziehen und Zurückpipettieren wurde eine Durchmischung der Lösungen mit dem Messpuffer erzielt. Vor der Applikation wurde die Perfusion der Messkammer gestoppt. Die im Folgenden angegebenen Konzentrationen entsprechen jeweils den in der Perfusionskammer errechneten. Mit Hilfe des Farbstoffs Toluidinblau wurde ermittelt, ob bei Superfusionsstimulation der Zellen die errechneten Konzentrationen in der Messkammer erreicht wurden. Die Messkammer und der zuleitende Schlauch wurden mit *Rat Ringer* Puffer gefüllt, die Spritze (welche in den folgenden Versuchen als Reservoir für die Liganden diente) mit Toluidinblau. Zuvor war die Konzentration der Toluidinblau-Lösung so eingestellt worden, dass photometrisch bei einer Wellenlänge von 630 nm eine Extinktion von 0,80 erreicht wurde. In Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass die Extinktion der Toluidinblau-Lösung bei Verdünnung linear abnahm. Die Toluidinblau-Lösung aus der Spritze wurde nun über das Schlauchsystem in die Messkammer geleitet, wo sie sich mit dem darin enthaltenen Messpuffer vermischte. Der aus der Messkammer abgepumpte Puffer (Messpuffer vermischt mit Toluidinblau) wurde sukzessiv in Fraktionen von je 500 µl aufgefangen. Anschließend wurde die Extinktion jeder Fraktion dieses Überstandes photometrisch gemessen. Die Absorption wurde in einem Graphen gegen die Fraktion aufgetragen. In dem Graphen ist zu sehen, dass die Extinktion in der Messkammer für eine kurze Zeit nahezu den Wert der Ausgangslösung erreichte (Abbildung 15). Somit ist für die folgenden Versuche davon auszugehen, dass die Konzentrationen der Liganden in der Messkammer kurzfristig dieselben Werte erreichen, wie in dem substanzhaltigen Puffer in der Spritze.

Bei erfolgreicher Stimulation wurde die Messung bis zum Maximum der Ratio-Änderung durchgeführt.

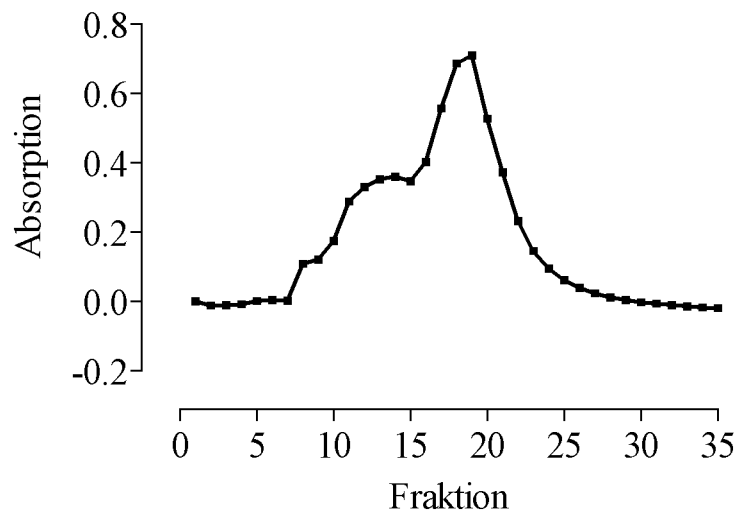


Abbildung 15: Messung der Extinktion einer in die Messkammer superfundierten Toluidinblau-Lösung

In die mit *Rat Ringer* Puffer gefüllte Messkammer wurde Toluidinblau einer Extinktion von 0,80 (630 nm) superfundiert. Die aus der Kammer abgepumpten Überstände wurden in Fraktionen zu je 500 µl gesammelt, ihre Absorption wurde mit einem Photometer bestimmt. Nachdem eine Durchmischung des blauen Farbstoffes mit dem Messpuffer stattgefunden hatte, wurde kurzfristig das Maximum der Absorption erreicht. Basierend auf diesen Ergebnissen kann in folgenden Versuchen davon ausgegangen werden, dass auch die superfundierten Liganden in der Messkammer die maximalen Konzentrationen erreichen.

In Kontrollversuchen mit Messpuffer konnte gezeigt werden, dass weder das Öffnen der Hähne noch das Anhalten der Pumpe oder die Bolusapplikation direkt in die Messkammer einen Einfluss auf die Fluoreszenz-Ratio hatten.

2.4.3.4.1 Kalium

Die Kaliumkonzentration im Zytosol von Neuronen ist deutlich höher als die im Extrazellulärraum. Da die Zellmembran selektiv permeabel für Kaliumionen ist, strömen aufgrund des osmotischen Gradienten Kaliumionen aus der Zelle hinaus. Größere Anionen, für welche die Zellmembran impermeabel ist, bleiben im Inneren der Zelle zurück. Es entsteht ein Membranpotential, welches auf der Zytosolseite negativ polarisiert ist. Dieses elektrochemische Potential verhindert einen völligen Ausgleich der Kaliumionen-Konzentration.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration führt zu einer Depolarisation präsynaptischer Nervenendigungen, in deren Folge es zur Öffnung spannungsabhängiger Kationenkanäle kommt. Durch diese Kanäle kommt es zu einem Einstrom von Natrium- und Calciumionen in die Zelle. Um einen Hinweis auf

die Vitalität der untersuchten Zellen zu erhalten, wurden diese mit Kalium stimuliert. Hierzu wurde *High-Kalium* Puffer (Kapitel 2.3.3.2) mit einer Kalium-Konzentration von 100 mM/l über eine Schlauchpumpe in die Messkammer superfundiert.

2.4.3.4.2 Acetylcholin

Durch Applikation von ACh sollte herausgefunden werden, ob die MOL2.3-positiven und -negativen Neurone des SPG unterschiedlich auf Stimulation mit dem wichtigsten klassischen Neurotransmitter reagieren. ACh wurde zum Teil über die Perfusionspumpe, zum anderen Teil als Bolus in die Messkammer gegeben.

2.4.3.4.2.1 Dosisabhängigkeit und Wiederholbarkeit

Zur Untersuchung einer calciumvermittelten Signaltransduktion durch Acetylcholin in MOL2.3-positiven und -negativen Zellen wurden diese mit Acetylcholin (Abbildung 16) in Konzentrationen von 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} M/l stimuliert. Zwischen den Applikationen wurde jeweils so lange gewartet, bis die Fluoreszenz Ratio der Zellen wieder die Basallinie erreicht und diese für 5 Minuten konstant gehalten hatte. Als Vorversuch für nachfolgende Versuchsserien wurde die Wiederholbarkeit der Antwort getestet. Damit sollte untersucht werden, ob der ACh-Effekt auswaschbar und vollständig reversibel ist, und ob es bei den Zellen zu einer Desensitisierung kommt. Hierzu wurden die Zellen dreimal mit Acetylcholin einer konstanten Konzentration (10^{-4} M/l) superfundiert. Auch hier wurde zwischen den Stimulationen gewartet, bis die Basallinie der Ratio erreicht und 5 Minuten lang konstant geblieben war.

Für beide Versuchsserien wurde Acetylcholin in eine Spritze pipettiert und von dort aus über eine Schlauchpumpe in die Messkammer geleitet.

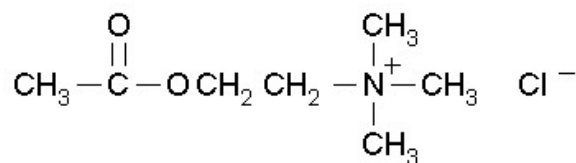


Abbildung 16 : Strukturformel von Acetylcholin

Mit diesem klassischen Neurotransmitter sollte das Antwortverhalten der cholinergen Rezeptoren MOL2.3-positiver wie -negativer Zellen des SPG charakterisiert werden. Auch mögliche Interaktionen des cholinergen mit dem nitrergen und dem PACAPergen System wurden untersucht.

2.4.3.4.2.2 Herkunft des Calciums nach Stimulation mit Acetylcholin

Weiterhin sollte ermittelt werden, ob das Calcium, welches zu einem etwaigen Anstieg der Fura-2 spezifischen Ratio führt, von extrazellulär oder aus intrazellulären Speichern stammt. In diesen Experimenten wurden die Zellen zu Beginn mit Acetylcholin einer Konzentration von 10^{-4} M/l stimuliert, um ihr Antwortverhalten zu demonstrieren. Nachdem über einen Zeitraum von 10 Minuten calciumfreier Puffer (Kapitel 2.3.3.3) in die Messkammer geleitet wurde, so dass den Zellen kein extrazelluläres Calcium mehr zur Verfügung stand, wurden die Zellen erneut mit Acetylcholin (10^{-4} M/l) stimuliert. 10 Minuten nach dieser Stimulation wurde der Puffer in der Messkammer wieder durch calciumhaltigen Messpuffer ersetzt. Nach weiteren 10 Minuten erfolgte eine erneute Applikation von Acetylcholin (10^{-4} M/l).

2.4.3.4.2.3 Agonisten

Weiterhin erfolgte eine pharmakologische Charakterisierung der cholinerg induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch Stimulation der Zellen mit Rezeptorsubtyp-spezifischen Agonisten.

Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.4.1) kann man nicotinerge und muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren unterscheiden. Für nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) ist eine große Anzahl natürlicher sowie synthetischer potenter Liganden bekannt. Ein synthetischer Agonist ist der klassische „ganglionäre Agonist“ DMPP (1,1-Dimethyl-4-phenylpiperaziniumiodid) (Boeckxstaens et al. 1993, Sharples and Wonnacott 2001). DMPP ist membranimpermeabel, da es ein quarternäres nitrogens Atom besitzt. DMPP zeigt nur eine geringe Selektivität zwischen den neuronalen nAChR Subtypen (Sharples and Wonnacott 2001). Ein muscarinerg Agonist ist der Carbaminsäureester Bethanechol, welcher resistent ist gegen Acetylcholin-abbauende Cholinesterasen (Forth et al. 2001).

Bethanechol (Abbildung 17) und DMPP (Abbildung 18) wurden in Konzentrationen von 10^{-5} M/l, Bethanechol zusätzlich von 10^{-4} M/l eingesetzt. Um die funktionelle Co-Expression der beiden verschiedenen Rezeptorsubtypen in einzelnen Zellen zu untersuchen, wurden in jedem Versuch beide cholinergen Agonisten sequentiell appliziert, wobei jeder Stimulation eine Auswaschphase folgte. Die Reihenfolge der Applikation der beiden Agonisten in der Superfusionsstimulations-Studie erfolgte randomisiert. Der Applikation der jeweiligen Agonisten ging dabei eine Kontrollstimulation mit Acetylcholin (10^{-4} M/l) voraus. Außerdem wurde jeder Versuch erst nach einer abschließenden Applikation von Acetylcholin (10^{-4} M/l) beendet, um zu überprüfen, ob sich die Reaktivität der entsprechenden Zelle geändert hat.

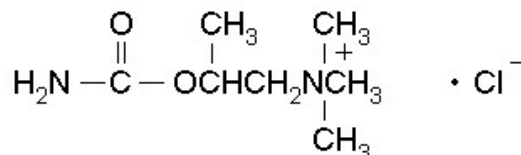


Abbildung 17 : Strukturformel von Bethanechol

Mit dem Carbaminsäureester Bethanechol wurde untersucht, ob die ganglionären Zellen funktionelle muscarinerge Acetylcholinrezeptoren exprimieren.

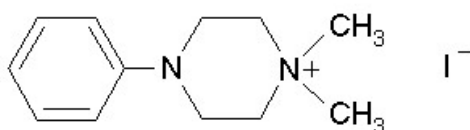


Abbildung 18 : Strukturformel von DMPP

DMPP gilt als klassischer Agonist für in Ganglien vorkommende nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren.

2.4.3.4.2.4 Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor Blocker

Neuronale nAChR autonomer Ganglien sind aus den Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$ und $\beta 4$ zusammengesetzt (Skok 2002). In autonomen Ganglien kommen vor allem heteromere $\alpha 3\beta 4$ und homomere $\alpha 7$ nAChR vor. Mit Hilfe spezifischer Acetylcholin-Rezeptor Blocker ermittelt werden, welche Kombinationen an Untereinheiten in den MOL2.3-positiven und -negativen Zellen vorkommen.

Der N/P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanal Blocker ω -Conotoxin MVIIC blockiert selektiv $\alpha 3\beta 4$ nAChR (Kulak et al. 2001, Skok 2002). Das Toxin hat keinen Einfluss auf $\alpha 7$ nAChR (Sharples and Wonnacott 2001). MLA (Abbildung 19) dagegen ist ein extrem potenter und selektiver Antagonist $\alpha 7$ homomerer nAChR (Sharples and Wonnacott 2001, Skok 2002).

In den Versuchen wurde zunächst jeweils das Antwortverhalten der Zellen auf Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) untersucht. Nach 5-minütiger Auswaschphase folgte eine Stimulation von zweiminütiger Dauer mit einem der beiden nAChR-Blocker (Bolusapplikation von MLA 10^{-5} M/l und ω -Conotoxin MVIIC 10^{-6} M/l; jeweils Endkonzentration in der Messkammer), um zu zeigen, ob der jeweilige Blocker selbst einen Einfluss auf den zellulären Ca^{2+} -Spiegel hat. Nachdem die Zellen wiederum ausreichend lange mit Puffer superfundiert worden waren, wurden sie erneut mit dem jeweiligen Blocker inkubiert. Nach zwei Minuten wurde zusätzlich zu dem Blocker ACh in die Kammer pipettiert. Am Ende eines jeden Versuchs stand wiederum die Stimulation mit ACh alleine.

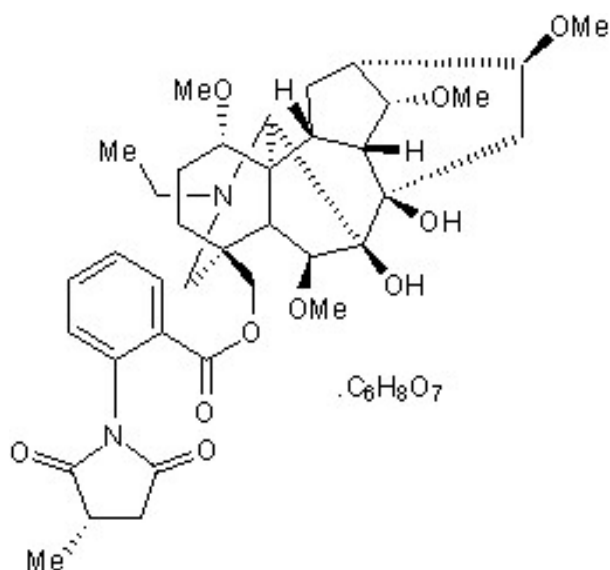


Abbildung 19 : Strukturformel von MLA

Der nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor Antagonist MLA blockiert selektiv homomere $\alpha 7$ AChR, welche häufig in autonomen Ganglien lokalisiert sind.

2.4.3.4.3 Calcium-Kanal Blocker

In Neuronen dienen spannungsgesteuerte Calciumkanäle der Transduktion elektrischer Signale. Die Kanäle ermöglichen einen vorübergehenden Ca^{2+} -Einstrom entlang eines elektrischen und konzentrationsabhängigen Gradienten vom Extrazellulärraum in die Zelle hinein. Man unterscheidet Calciumkanäle vom L- (*long-lasting*), N- (*neuronal*), P- (kommt in Purkinje-Zellen vor), Q- (weil Q der nächste Buchstabe im Alphabet nach P ist) und R-Typ (*resistant*) (Ertel et al. 2000).

In neuronalen Zellen des SPG der Ratte konnten immunhistologisch N-Typ Calciumkanäle in Somata und in Neuriten lokalisiert werden (Liu et al. 2000c). Diesen Kanälen wird eine bedeutende Rolle bei der Regulation der neuronalen Calciumströme und der Freisetzung des Neuromodulators NO zugesprochen (Liu et al. 2000c, Liu et al. 2002).

Um zu differenzieren, welcher der verschiedenen Kanäle in einem Zelltyp exprimiert wird, kann man sich bestimmter Calciumkanal-Blocker bedienen.

Bei Conotoxinen handelt es sich um hochtoxische Peptide tropischer Meeresschnecken der Familie Conus. Conotoxine werden, basierend auf ihrer Struktur und biologischen Aktivität, in verschiedene Familien klassifiziert. Nur Vertreter der ω -Conotoxin Familie besitzt die prägnante Eigenschaft, Calciumkanäle zu blockieren (Cox and Dunlap 1994, Forth et al. 2001, Kochegarov 2003), und so die Ausschüttung von Neurotransmittern zu verhindern (Kochegarov 2003, Olivera et al. 1987, Vega et al. 1995).

Das zur Stoffgruppe der Dihydropyridine gehörende Nifedipin (Abbildung 20) blockiert kurzfristig und selektiv L-Typ Calciumkanäle (Garcia et al. 2003). Dihydropyridine binden mit einer hohen Affinität an inaktive (geschlossene) Calciumkanäle und modulieren die spannungsgesteuerte Öffnungswahrscheinlichkeit (Forth et al. 2001, Kochegarov 2003).

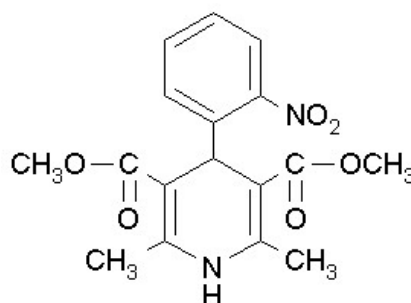


Abbildung 20 : Strukturformel von Nifedipin

Nifedipin bindet selektiv und mit hoher Affinität an inaktive, spannungsgesteuerte L-Typ Calciumkanäle und blockiert diese.

Mit Hilfe dieser selektiven Calciumkanalblocker sollte untersucht werden, ob die Aktivierung des Acetylcholin-Rezeptors zur Öffnung von L- oder N-Typ Calciumkanälen führt.

Die N-Typ Calciumkanalblocker ω -Conotoxin SVIB (reversibler N-Typ Ca^{2+} -Kanal Blocker) und ω -Conotoxin MVIIA (reversibler N-Typ Ca^{2+} -Kanal Blocker) wurden in einer Konzentration von 10^{-5} M/l eingesetzt (Hirata et al. 1997, Sanger et al. 2000). Das jeweils verwendete Toxin wurde bei ausgeschalteter Pumpe direkt in die Messkammer pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation, in welcher das Toxin an den Rezeptor binden konnte, wurde Acetylcholin (10^{-4} M/l) als Bolus in die Kammer gegeben.

Nifedipin wurde ebenfalls in einer Konzentration von 10^{-5} M/l eingesetzt. Die Applikation erfolgte auf dieselbe Weise wie bei den ω -Conotoxinen.

Jeweils vor und nach der kombinierten Applikation von ACh und dem jeweiligen Blocker wurden die Zellen mit ACh (10^{-4} M/l) alleine stimuliert. Zwischen den Applikationen wurden die Zellen über mindestens fünf Minuten mit Puffer superfundiert.

2.4.3.4.4 Stickstoffmonoxid

Der atypische, volatile Neurotransmitter oder –modulator Stickstoffmonoxid (NO) konnte sowohl in präganglionären Neuronen des SPG nachgewiesen werden

als auch in den ganglionären Neuronen selbst (Kapitel 1.4.2). Mit Hilfe der folgenden Versuchsreihen sollte untersucht werden, ob NO bei den Zellen des SPG eine Zellantwort auslösen kann, und ob NO einen Einfluss auf die cholinerg vermittelte Signaltransduktion dieser Zellen hat. Zur Untersuchung einer etwaigen gegenseitigen Beeinflussung dieser beiden Transmittersysteme wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt: Zum einen wurden Co-Stimulationen mit ACh und NO durchgeführt, zum anderen wurde die endogene, enzymatische nNOS-Aktivität kompetitiv gehemmt und geprüft, ob dies das Antwortverhalten der Zellen auf cholinerge Stimulation hin ändert. Außerdem sollte geklärt werden, ob zwischen den MOL2.3-positiven und –negativen Zellen Unterschiede bestehen.

2.4.3.4.4.1 NO-Donoren

In dieser Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob die ganglionären Zellen durch den Neuromodulator NO zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration angeregt werden können. DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid) und Nor-1 ((±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid) stellen hochpotente NO-Donoren dar (Feil et al. 2002, Ferrero et al. 1999, Takeuchi et al. 2001, Ueki et al. 2002, Yu et al. 2002). Da beide Substanzen sehr schnell NO freisetzen, welches wiederum innerhalb kurzer Zeit durch Oxidation inaktiviert wird (Ueki et al. 2002), wurde sowohl DEA als auch Nor-1 unmittelbar nach Präparation der Applikationslösungen als Bolus mit einer Konzentration von 10^{-2} M/l (Endkonzentration in der Kammer 10^{-3} M/l) direkt in die Messkammer pipettiert.

Sowohl für DEA als auch für Nor-1 wurde zum einen die Auswirkung des NO-Donors alleine auf die $[Ca^{2+}]_{iz}$ untersucht, als auch der Einfluss von NO auf die cholinerge Signaltransduktion. Hierzu wurden ACh und der jeweilige NO-Donor gleichzeitig in die Messkammer pipettiert.

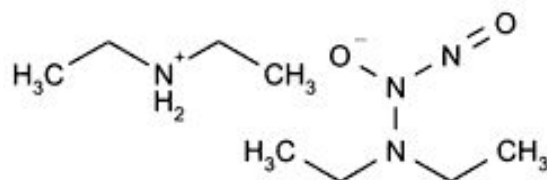


Abbildung 21: Strukturformel von DEA

DEA setzt den atypischen, gasförmigen Neuromodulator Stickstoffmonoxid frei, welcher Zellmembranen durch Diffusion überwinden kann. Mit Hilfe von DEA wurde untersucht, ob die Zellen des SPG reaktiv sind für NO.

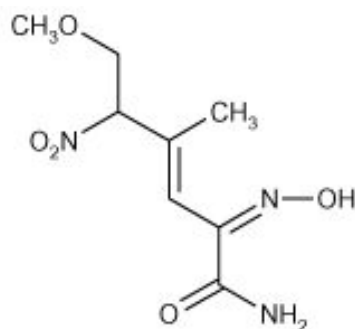


Abbildung 22: Strukturformel von Nor-1

Auch Nor-1 ist ein hochpotenter NO-Donor, welcher in dieser Arbeit zur Untersuchung der nitrogenen Aktivierung MOL2.3-positiver und -negativer Zellen diente.

2.4.3.4.4.2 Vinyl-L-NIO

Bei Vinyl-L-NIO (Abbildung 23) handelt es sich um eine Substanz, welche hochselektiv die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase hemmt (Bretscher et al. 2003, Herring et al. 2000, Sullivan et al. 2002). Da Vinyl-L-NIO mit L-Arginin um das aktive Zentrum der nNOS konkurriert, handelt es sich um eine kompetitive Hemmung. Die Inaktivierung der nNOS durch Vinyl-L-NIO ist Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig. In Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff (O_2) ist die Hemmung irreversibel. Unter den bislang bekannten nNOS-inaktivierenden Substanzen stellt Vinyl-L-NIO das potenteste und selektivste nNOS-spezifische L-Arginin-Analogon dar (Babu and Griffith 1998).

Es wurden Versuchsserien durchgeführt, in denen der Einfluss der Hemmung der nNOS auf die cholinerge Signaltransduktion untersucht wurde. Vinyl-L-NIO wurde als Bolus in die Messkammer pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 10^{-5} M/l erreicht wurde. Nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO erfolgte die Stimulation der Zellen mit ACh in Anwesenheit des nNOS-Blockers. Auch hier standen am Beginn und am Ende jedes Versuchs Stimulationen mit ACh.

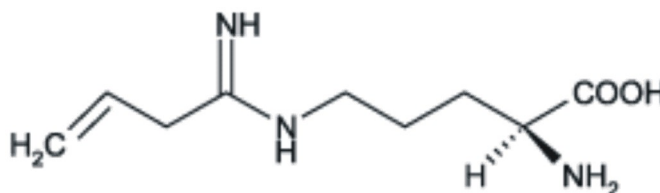


Abbildung 23 : Strukturformel von Vinyl-L-NIO

Vinyl-L-NIO hemmt kompetitiv und hochselektiv die neuronale Isoform des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase.

2.4.3.4.5 PACAP

Auch das Neuropeptid PACAP scheint eine Rolle bei der Signaltransduktion in Zellen des SPG zu spielen (Kapitel 1.4.3). Mit den Versuchen sollte gezeigt werden, ob die MOL2.3-Rezeptor exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen auf extrazelluläres PACAP reagieren. Außerdem wurde eine eventuelle Beeinflussung der cholinergen Signaltransduktion durch PACAP untersucht, indem Co-Stimulationen mit ACh und PACAP durchgeführt wurden. PACAP wurde ebenfalls als Bolus in einer Konzentration von 10^{-7} M/l (Endkonzentration in der Kammer) in die Messkammer appliziert.

2.4.3.4.6 Noradrenalin

Noradrenalin (NA) (Abbildung 24) repräsentiert einen der klassischen neuronalen Botenstoffe im Zentralnervensystem und in den postganglionär-sympathischen Neuronen (Forth et al. 2001). Bei den Rezeptoren für Noradrenalin handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche in die Membranen der Zielzellen integriert sind. Man unterscheidet α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren. α_1 -Rezeptoren sind postsynaptisch lokalisiert, α_2 -, β_1 - und β_2 -Rezeptoren dagegen prä- und postsynaptisch. β_3 -Rezeptoren scheinen vor allem in Fettzellen exprimiert zu werden (Frey and Löscher 1996). Das Ausmaß der Freisetzung von Noradrenalin wird durch präsynaptische Adrenozeptoren (Autorezeptoren) reguliert. α_1 -Rezeptoren steuern über den 2nd messenger IP_3 Ca^{2+} -Kanäle, α_2 -Rezeptoren unterbrechen über eine Konzentrationsverminderung des 2nd messengers cAMP einen K^+ -Ruhestrom und β -Rezeptoren erhöhen die K^+ -Leitfähigkeit über cAMP (Frey and Löscher 1996).

Neben den Adrenozeptoren in den Membranen der sympathischen Neurone und der Zielzellen konnten diese Rezeptoren auch in Membranen einiger postganglionärer parasympathischer Neurone nachgewiesen werden. So finden sich z.B. α_1 -Rezeptoren im *Ganglion cardiacum* der Ratte, welche zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen führen (Ishibashi et al. 2003), α -Rezeptoren in intracardialen Ganglien, welche Ca^{2+} -Ströme hemmen (Xu and Adams 1993) und β_2 -Rezeptoren in parasympathischen Ganglien in der Trachea vom Frettchen, welche die ganglionäre Transmission inhibieren (Skoogh 1986, Skoogh and Svedmyr 1989).

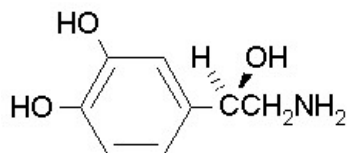


Abbildung 24 : Strukturformel von Noradrenalin

Da in der Literatur die Expression von Adrenoceptoren in postganglionären, parasymphathischen Ganglien beschrieben wird, sollte in dieser Studie mit Noradrenalin getestet werden, ob solche Rezeptoren auch hier lokalisiert sind.

In dieser Versuchsserie wurde untersucht, ob die ganglionären Zellen auf Stimulation mit extrazellulärem Noradrenalin mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagieren. Noradrenalin wurde in einer Konzentration von 10^{-4} M/l wie oben beschrieben über die Pumpe in die Messkammer geleitet.

2.4.3.4.7 Glutamat

Die Aminosäure Glutamat (Abbildung 25) ist in Neuronen des zentralen Nervensystems weit verbreitet und repräsentiert den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter. Auch im peripheren, insbesondere autonomen Nervensystem konnte die Existenz von Glutamat nachgewiesen werden (McCall 1988, Senba et al. 1991).

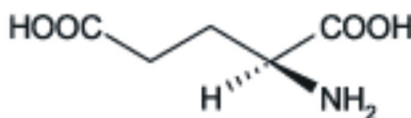


Abbildung 25 : Strukturformel von Glutamat

Durch Applikation von Glutamat sollte untersucht werden, ob in den Neuronen des SPG Rezeptoren für diesen wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter existieren.

Die Gruppe der Glutamat-Rezeptoren kann in ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterteilt werden. Die ionotropen Rezeptoren (ligandenaktivierte Ionenkanäle) lassen sich darüber hinaus in NMDA- (N-Methyl-D-aspartat) sowie nicht-NMDA Rezeptorsubtypen differenzieren (Hollmann et al. 1989, Masu et al. 1991, Moriyoshi et al. 1991). Die nicht-NMDA Rezeptoren sind die sogenannten AMPA- und Kainat-Typen. Im Falle der AMPA-Rezeptoren konnten 4 Subtypen, und zwar GluR1-4, kloniert werden (Hollmann et al. 1989). Im SPG der Ratte

konnten immunhistochemisch Glu1-3 Rezeptoren in Hauptneuronen und SIF-Zellen, sowie Glu4 Rezeptoren in SIF-Zellen lokalisiert werden (Kiyama et al. 1993).

In dieser Versuchsreihe sollte getestet werden, ob funktionelle Glutamat-Rezeptoren auch in den Zellen des SPG der Maus vorkommen. Hierzu wurde Glutamat in einer Konzentration von 10^{-3} M/l über die Schlauchpumpe in die Messkammer geleitet.

2.4.3.5 Auswertung

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ in den ganglionären Zellen der Primärkultur wurde mit Hilfe eines bildgebenden, computergestützten Verfahrens, mit welchem mehrere Zellen gleichzeitig erfasst werden konnten, bestimmt. Die Aufzeichnung der Calciumströme erfolgte in Nicht-Echtzeit auf Einzelzellniveau. Die durch die CCD-Kamera gemessenen Intensitätswerte der Lichtemission bei 515 nm nach Anregung einzelner Fura-2 beladener Zellen mit den für Fura-2 spezifischen Wellenlängen von 340 und 380 nm wurden wechselweise in den Computer eingelesen. Während der Stimulationen wurden die Fluoreszenz-Intensitäten alle zwei Sekunden gemessen, während der Auswaschphasen alle fünf Sekunden, um ein übermäßiges Ausbleichen des Fura-2 zu verhindern. Der vom Computer ermittelte Quotient (340 nm/380 nm Ratio) wurde in Abhängigkeit von der Zeit in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die gemessenen Werte wurden gespeichert und zur Bearbeitung und Darstellung in das Programm Sigmaplot[®] exportiert.

Für jede applizierte Substanz wurde prozentual ermittelt, wie viele der untersuchten Zellen stimuliert werden konnten. Bei der Auswertung wurden nur solche Zellen berücksichtigt, welche am Ende einer Versuchsreihe auf Stimulation mit Acetylcholin oder Kaliumchlorid noch mit einer Erhöhung der Ratio reagierten. Für die reagierenden Zellen wurden der arithmetische Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) der Ratioänderung errechnet. Die Daten wurden mit Hilfe des Computer-Programms Graph Pad Prism[®] in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Ebenfalls mittels der Graph Pad Prism[®]-Software wurden statistische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden zum einen die MW der Ratioänderungen innerhalb einer Versuchsreihe verglichen, zum anderen die MW entsprechender Stimulationen bei MOL2.3-positiven und -negativen Zellen. Als statistischer Test wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U Ranking Test gewählt. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte wurden folgendermaßen kenntlich gemacht (Tabelle 4):

* (2P 0,01 - 0,05), ** (2P 0,001 - 0,01) und *** (2P < 0,001) beim Vergleich wiederholter Stimulationen mit Acetylcholin und beim Vergleich von Acetylcholin mit Acetylcholin in Kombination mit einem weiteren Liganden oder Blocker.

(2P 0,01 – 0,05), ## (2P 0,001 - 0,01) und ### (2P < 0,001) beim Vergleich von Stimulationen mit Acetylcholin mit einem anderen Liganden bzw. Blocker.

x (2P 0,01 - 0,05), xx (2P 0,001 - 0,01) und xxx (2P < 0,001) beim Vergleich zweier Liganden bzw. Blocker untereinander und beim Vergleich eines Liganden bzw. Blocker mit Acetylcholin in Kombination mit einem weiteren Liganden oder Blocker.

Bei $2P > 0,05$ werden die Daten als nicht signifikant unterschiedlich voneinander definiert.

Tabelle 4 : Kennzeichnung signifikanter Unterschiede bei der statistischen Auswertung der Änderungen der Fluoreszenz Ratio

	Acetylcholin	Acetylcholin + weiterer Ligand bzw. Blocker	Ligand bzw. Blocker
Acetylcholin	*	*	#
Acetylcholin + weiterer Ligand bzw. Blocker	*	*	x
Ligand bzw. Blocker	#	x	x

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Kontrollen

Für den immunocytochemischen Nachweis parasymphatisch relevanter Transmittersysteme bzw. deren Schlüsselenzyme in Neuronen des *Ganglion sphenopalatinum* der neonatalen MOL2.3-IGITL Maus wurde zunächst in Vorversuchen die Spezifität der einzusetzenden polyklonalen Antikörper an neuronalen Gewebsstrukturen des ZNS adulter Ratten und Mäuse mit bekannter Antigenexpression getestet. Hierzu wurden die Antikörper unter identischen Versuchsbedingungen (Ak-Konzentration, Puffersystem, Inkubationsdauer und –temperatur, Typ und Fluorophor des zweiten Antikörpers) eingesetzt.

NSE und PGP9.5 werden im Zytoplasma von Neuronen exprimiert und dienen als bewährte Markerproteine für den immunocytochemischen Nachweis von Neuronen (Day 1992). Beide Antigene konnten sowohl bei der adulten Ratte, als auch bei der MOL2.3-IGITL Maus in zahlreichen Zellen der unterschiedlichsten neuronalen Gewebe dargestellt werden (Thompson et al. 1983), so z.B. auch in Neuronen der *Area postrema* des Gehirnstamms (Vinores et al. 1984). In den immunmarkierten Zellen beider Tierarten war das Zytoplasma deutlich gefärbt, die Nuclei dagegen nicht (Abbildung 26; Abbildung 27).

Die Existenz von ChAT und VACHT, welchen in dieser Arbeit als cholinergen Markern eine bedeutende Rolle zukam, wird in präganglionären Neuronen des vegetativen NS, spinalen Motoneuronen, einigen Zellen des Cortex und der vorderen präoptischen Region, postganglionär-parasymphatischen Neuronen, zahlreichen Neuronen des Darmnervensystems und postganglionär-symphatischen Neuronen für die Innervation der Schweißdrüsen beschrieben (Forth et al. 2001, Tohyama and Takatsuji 1998). Mittels der in den vorliegenden Versuchen eingesetzten Antikörper gegen ChAT und VACHT konnten in den beschriebenen neuronalen Geweben (Cortex, Hirnstamm, Motoneuronen des Rückenmarks, Hinterwurzelganglien) zahlreiche Neurone detektiert werden, so dass von einer für beide Nagerspezies hohen Antigenspezifität beider Antikörper ausgegangen werden konnte (Arvidsson et al. 1997, Koch and Berg 1993) (Abbildung 26; Abbildung 27). Der anti-VACHT-Antikörper markierte in vielen Geweben synaptische Endigungen, besonders ausgeprägt im Hirnstamm und im cerebralen Cortex (Gilmor et al. 1996).

Neuronale NOS als NO-generierendes Enzym ist ebenfalls sehr weit verbreitet im zentralen und peripheren Nervensystem, unter anderem im cerebralen Cortex, im Intermediolateralhorn des Rückenmarks, in Hinterwurzelganglien und im *Ganglion*

submandibulare (Ceccatelli et al. 1994, Dawson et al. 1991, de Vente et al. 2001, Gonzalez-Hernandez and Rustioni 1999, Morris et al. 1993, Soinila et al. 1996). In all diesen Geweben der Ratte und der Maus konnten mittels des anti-nNOS-Ak immunreaktive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 26; Abbildung 27).

Das Tachykinin Substanz P (SP) wird in weiten Gebieten des Gehirns, im Rückenmark sowie in autonomen und Hinterwurzel-Ganglien exprimiert (Dun et al. 1996, Gibbins and Morris 1987, Hardebo et al. 1992, Lundblad et al. 1983). Dabei findet sich der Neurotransmitter oder –modulator nicht nur im Zytoplasma der Zellen, sondern zusätzlich in deren Fasern (Tohyama and Takatsuji 1998). In den Kontrollversuchen am Rückenmark und an Hinterwurzelganglien konnte auch für den anti-SP-Antikörper gezeigt werden, dass dieser spezifisch ist (Abbildung 26; Abbildung 27).

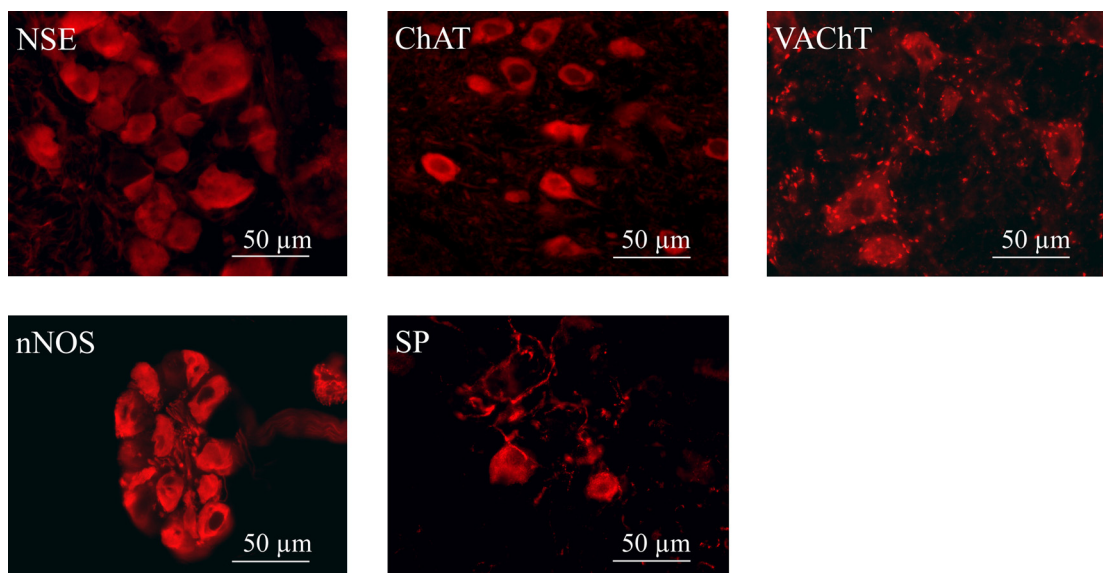


Abbildung 26 : Nachweis der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper an der Ratte

Mit dem anti-NSE Antikörper konnten Neurone in der *Area postrema* detektiert werden. Die cholinergen Marker ChAT und VACHT färbten Somata von Motoneuronen in der grauen Substanz des Rückenmarks, wo auch VACHT-immunreaktive synaptische Endigungen zu beobachten waren. Der anti-nNOS-Antikörper wurde unter anderem am *Ganglion submandibulare* untersucht, wo er ein deutliches zelluläres Signal lieferte. Im Rückenmark konnten SP-positive Somata und Nervenfasern detektiert werden.

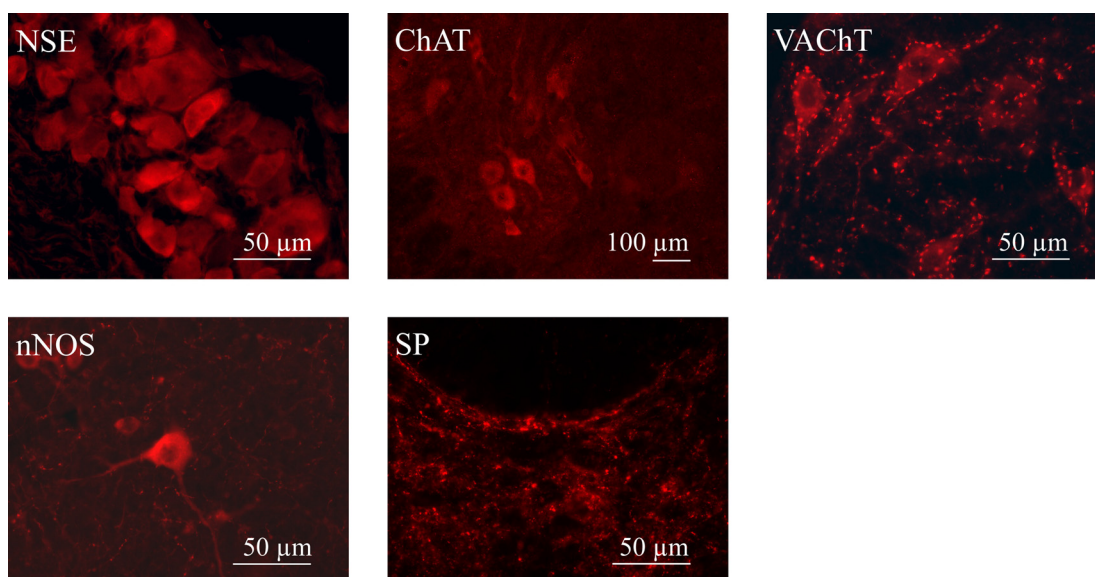


Abbildung 27 : Nachweis der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper an der MOL2.3 –IGITL Maus

Der Antikörper gegen NSE markierte auch bei der Maus Neurone in der *Area postrema*. ChAT und VACHT detektierten als cholinerge Markerproteine wie bei der Ratte Somata von Motoneuronen in der grauen Substanz des Rückenmarks, wo VACHT zusätzlich zu den Somata in synaptischen Endigungen zu finden war. Der anti-nNOS-Antikörper markierte unter anderem Neurone im Lateralhorn des Brustmarks. Im Rückenmark konnten zahlreiche SP-immunreaktive Nervenfasern und einzelne Neurone dargestellt werden.

3.1.2 Morphologie des Ganglion sphenopalatinum

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, stellt sich das SPG bei den verschiedenen Tierarten als nicht einheitlich dar (Kapitel 1.3.1) (Nickel et al. 1992). Bei der Auswertung der immunhistochemischen Versuche dieser Arbeit zeigte sich, dass bei der Maus, ebenso wie beim Fleischfresser, nur jeweils ein Ganglion auf jeder Seite ausgebildet war (Abbildung 28). Die ipsi- und kontralateralen Ganglien der neonatalen Maus erwiesen sich fluoreszenzmikroskopisch betrachtet von einheitlicher Struktur und nicht, wie z.B. beim Schwein beschrieben (Cuthbertson et al. 1997), aus Mikroganglien zusammen gesetzt. In den coronalen Gewebsschnitten des Kopfes der transgenen Maus zeigte sich der Querschnitt des Ganglions an dessen rostralen und caudalen Enden als nahezu rund, während zur Mitte des Ganglions hin der Querschnitt eine mehr trianguläre Form annahm. Bei hoher Zelldichte und kompakter Konfiguration der Neurone im SPG der Maus konnten in einigen Schnitten zusätzlich Nervenfasern dargestellt werden, die aus dem Ganglion herauszogen.

Auch bei der Präparation der sphenopalatinen Ganglien unter dem Fluoreszenzbinokular für die Zellkultur stellte sich das Ganglion als einzelnes,

solides Gewebe dar. Es waren deutliche, ebenfalls z.T. grün fluoreszierende Faserzüge zu erkennen, die vom Ganglion aus nach rostral bzw. caudal zogen.

3.1.3 GFP und NSE

In einer ersten Versuchsserie sollte ermittelt werden, in welchem Prozentsatz der Neurone des *Ganglion sphenopalatinum* das MOL2.3-Rezeptorprotein exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Doppelmarkierungsstudien durchgeführt. Die eingesetzten Antikörper waren zum einen gegen das Protein GFP gerichtet, welches als Transgen mit dem MOL2.3-Rezeptor co-exprimiert wird, zum anderen gegen das neuronale Markerenzym Neuronen spezifische Enolase (NSE) (Abbildung 28).

Bei der quantitativen fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Präparate zeigte sich, dass in beiden sphenopalatinen Ganglien neonataler MOL2.3-IGITL Mäuse eine große Zahl NSE-immunreaktiver Zellen lokalisiert war (1043 ± 75 pro Tier (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.)) (Abbildung 29, a-c). Diese NSE-positiven Zellen waren in allen Präparaten gleichmäßig über das gesamte Ganglion verteilt (Abbildung 28). Die Auszählung der GFP-positiven Zellen ergab, dass im Durchschnitt 584 ± 45 Zellen pro Tier eine deutliche Immunreaktivität für GFP aufwiesen. 557 ± 49 Zellen pro Tier waren sowohl von den anti-NSE- als auch von den anti-GFP-Antikörpern detektiert worden. Prozentual gesehen bedeutet das, dass $53,2 \pm 1,4 \%$ der NSE-positiven Zellen ebenfalls immunreaktiv waren für GFP, während der überwiegende Teil der GFP-exprimierenden Zellen ($95,4 \pm 1,3 \%$) auch NSE-immunreaktiv war (Abbildung 29, d & e).

Da es sich bei NSE um ein Markerprotein für Neuronen handelt (Vinores et al. 1984), weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass etwa die Hälfte der neuronalen Zellen des *Ganglion sphenopalatinum* den MOL2.3-Rezeptor exprimierten, welcher über die GFP-positive Immunfluoreszenz detektiert werden konnte. Nur etwa 5 % aller MOL2.3-positiven Zellen erwiesen sich als nicht immunreaktiv für NSE.

Immunhistochemische Doppelmarkierungsstudien mit Antiseren gegen GFP und einen weiteren neuronalen Marker, das Protein PGP9.5 (PGP, *protein gene product*), führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Sowohl die absoluten und relativen Zellzahlen waren ähnlich, als auch die Tatsache, dass beide Antigene gleichmäßig durch das Ganglion verteilt vorkamen (Daten nicht gezeigt).

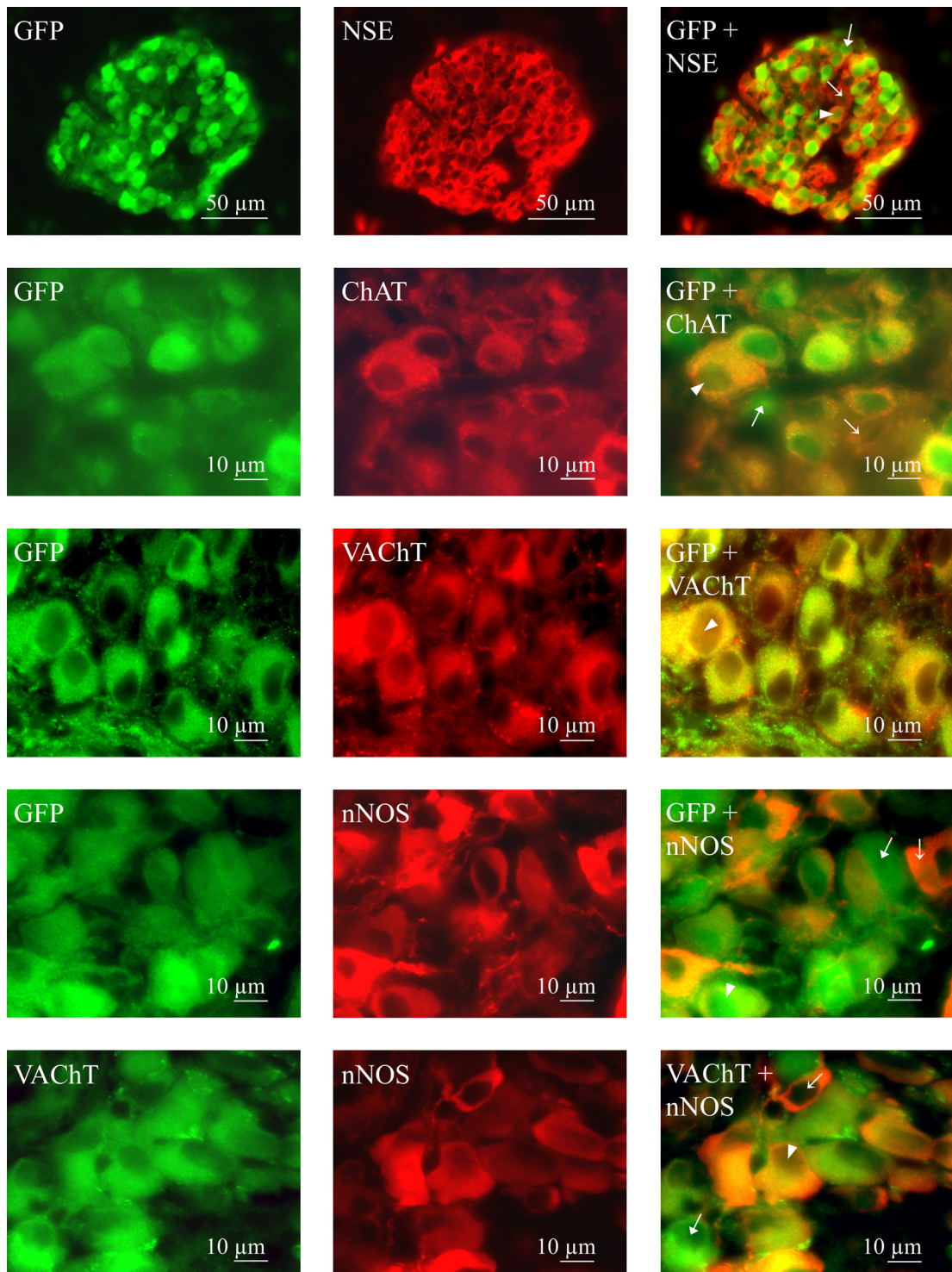


Abbildung 28: Transmitterspezifische, immunfluoreszenzhistochemische Charakterisierung des *Ganglion sphenopalatinum* der MOL2.3-IGITL Maus

In der linken und der mittleren Spalte der oberen vier Zeilen sind jeweils die grünen GFP-spezifischen Signale bzw. roten NSE-, ChAT-, VACHT oder nNOS-spezifischen Signale zu sehen; die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Signale.

Die unterste Zeile zeigt die Ergebnisse der VACHT- (links, grüne Signale) und nNOS- (mitte, rote Signale) Doppelmarkierung (rechts, Überlagerung der grünen VACHT- und der roten nNOS-Signale).

Die Pfeile in den Abbildungen der rechten Spalte weisen auf jeweils eindeutig immunreaktive Zellen hin (➔ grün, ➔ rot, ► doppelt markiert).

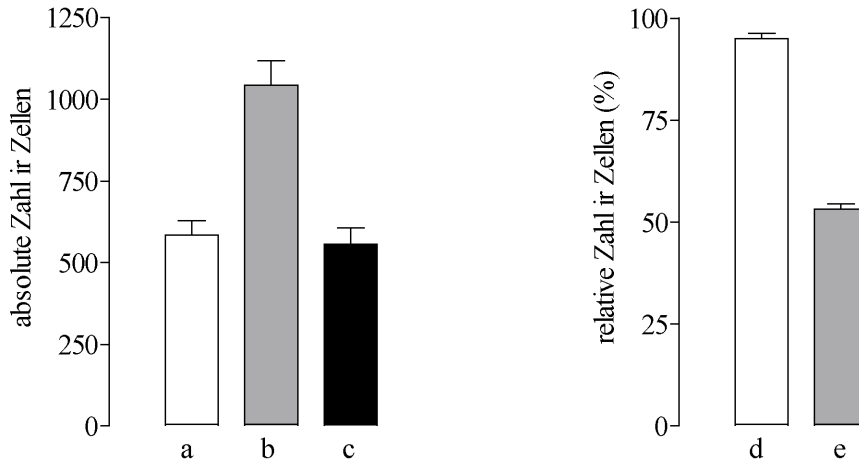


Abbildung 29 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE) sowie deren Co-Lokalisation

Das linke Balkendiagramm zeigt die absolute Zahl GFP- (a) und NSE- (b) immunreaktiver (ir), sowie doppelt markierter Zellen (c) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) von fünf Tieren (10 Ganglien).

Das rechte Diagramm demonstriert den prozentualen Anteil doppelt markierter Zellen bezogen auf die GFP- (d) und NSE- (e) immunpositiven Zellen. Die Balken geben die arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien) an.

3.1.4 GFP und ChAT

Das Ganglion *sphenopalatinum* repräsentiert, wie bereits erwähnt, ein parasympathisches Ganglion. Um die Frage der Co-Lokalisation des MOL2.3-Rezeptors mit cholinergen Markern zu klären, wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Antikörpern durchgeführt, die spezifisch gegen GFP, als Marker für den MOL2.3-Rezeptor, und gegen die Cholinacetyltransferase (ChAT) gerichtet waren (Abbildung 28). Das Enzym ChAT stellt das alleinige Schlüsselenzym für die Synthese des klassischen Neurotransmitters Acetylcholin dar und kommt im zentralen wie peripheren Nervensystem ausschließlich in cholinergen Zellen vor (Kapitel 2.4.1.3.1.4).

Bei der quantitativen Erfassung dieser Versuchsreihe fielen sehr viele ChAT-immunreaktive Zellen auf, die genau wie die zuvor beschriebenen, NSE-positiven Zellen gleichmäßig über das Ganglion verteilt waren (Abbildung 28). Pro Tier konnte eine durchschnittliche Zahl von 776 ± 41 cholinergen Zellen ermittelt

werden. Mittels des GFP-Antikörpers konnten 593 ± 47 ganglionäre Zellen als MOL2.3-positiv identifiziert werden. Bei 551 ± 46 Zellen war zu erkennen, dass eine Doppelmarkierung durch beide Antikörper stattgefunden hat (Abbildung 30, a-c).

Aus diesen absoluten Zellzahlen wurde berechnet, dass $92,9 \pm 0,6 \%$ aller MOL2.3-positiven Zellen ebenfalls immunreaktiv für ChAT und demzufolge cholinerg waren, während $70,9 \pm 3,2 \%$ der ChAT-positiven Zellen das Protein GFP exprimierten (Abbildung 30, d & e).

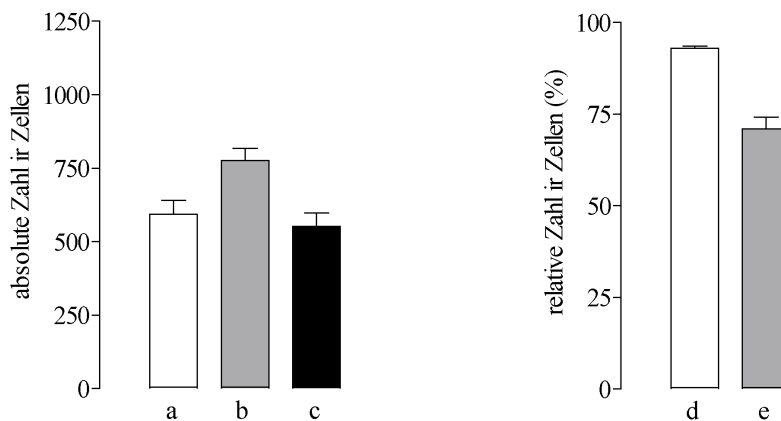


Abbildung 30 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) sowie deren Co-Lokalisation

Das linke Balkendiagramm zeigt die absolute Zahl GFP- (a) und ChAT- (b) immunreaktiver (ir), sowie doppelt markierter Zellen (c) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien).

Das rechte Diagramm demonstriert den prozentualen Anteil doppelt markierter Zellen bezogen auf die GFP- (d) und ChAT- (e) immunpositiven Zellen. Die Balken geben die arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien) an.

3.1.5 *GFP und VACHT*

Ergänzend zu der Studie mit dem cholinergen Marker ChAT wurde eine weitere Versuchsreihe mit einem anderen cholinergen Marker durchgeführt. Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT) ist nicht nur im Zytoplasma der Zellen lokalisiert, wie es bei ChAT der Fall ist, sondern auch in Vesikelmembranen im Bereich der synaptischen Endigungen. Die Detektion von VACHT sollte auf Grund dieser Tatsache nicht nur Aufschluss darüber geben, ob es sich bei der

entsprechenden Zelle um eine cholinerge Zelle handelt, sondern zusätzlich Informationen darüber liefern, wohin die VACHT-positiven Zellen projizieren bzw. welche Zellen neuronale Informationen von cholinergen Zellen erhalten (Abbildung 28).

Doppelmarkierungsstudien zum Nachweis von VACHT und dem MOL2.3-Indikator GFP zeigten, dass in den untersuchten Ganglien im Mittel 785 ± 145 Zellen pro Tier VACHT exprimierten, während sich 593 ± 110 Neurona als GFP-positiv erwiesen. 530 ± 99 Zellen waren doppelt markiert (Abbildung 31, a-c). Von allen GFP-exprimierenden Zellen wurden 548 ± 23 pro Tier von VACHT-positiven Nervenzellendigungen kontaktiert. In der Umgebung der übrigen 45 ± 6 GFP-positiven Zellsomata konnte keine VACHT-Immunreaktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Prozentual betrachtet zeigte sich, dass $89,4 \pm 16,5$ % der GFP-immunreaktiven Zellen gleichzeitig positiv für VACHT waren und $67,5 \pm 12,4$ % der cholinergen Zellen den MOL2.3-Rezeptor exprimieren (Abbildung 31, d & e). Die GFP-positiven Zellen, welchen von VACHT-immunreaktiven synaptischen Endigungen umgeben waren, machen $92,3 \pm 1,1$ % aller GFP-positiven Zellen aus (Daten nicht gezeigt).

Sowohl die absoluten als auch die relativen Zellzahlen der beiden Versuchsreihen, in denen cholinerge Marker eingesetzt wurden, stimmen gut überein.

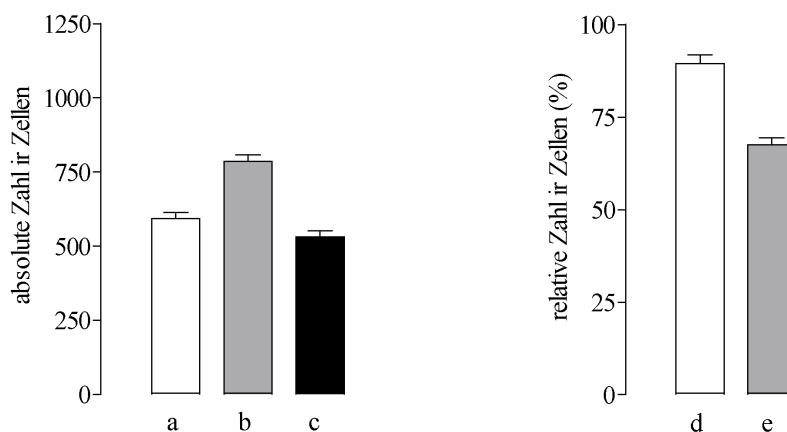


Abbildung 31 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, des vesikulären Acetylcholin-Transporters (VACHT) sowie deren Co-Lokalisation

Das linke Balkendiagramm zeigt die absolute Zahl GFP- (a) und VACHT- (b) immunreaktiver (ir), sowie doppelt markierter Zellen (c) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien).

Das rechte Diagramm demonstriert den prozentualen Anteil doppelt markierter Zellen bezogen auf die GFP- (d) und VACHT- (e) immunpositiven Zellen. Die Balken geben die arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien) an.

Zusammenfassend zeigten die Doppelmarkierungsstudien mit Antikörpern gegen die beiden cholinergen Markerproteinen und GFP, dass nahezu alle MOL2.3-positiven Zellen cholinerg waren, während etwa 70 % der cholinergen Zellen das MOL2.3-Rezeptorprotein nicht exprimierten.

3.1.6 GFP und nNOS

Zum Nachweis der Existenz nitrerger Zellen im SPG wurde ein Antikörper eingesetzt, welcher spezifisch gegen die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) gerichtet ist (Abbildung 28). Eine durchschnittliche Anzahl von 522 ± 37 Zellen pro Tier konnte immunhistologisch als nNOS-positiv identifiziert werden. 607 ± 38 Zellen erwiesen sich als eindeutig GFP-immunreaktiv und 452 ± 46 sind von beiden Antiseren detektiert worden (Abbildung 32, a-c). Auch in diesem Versuch stimmt die ermittelte absolute Zahl GFP-positiver Zellen mit den Zahlen der vorangegangenen Versuche überein.

Bezogen auf die Gesamtzahl MOL2.3-positiver Zellen erwiesen sich $73,8 \pm 3,1$ % als nitrerg. Von den nNOS-immunreaktiven Zellen zeigten $85,9 \pm 3,2$ % eine Co-Lokalisation von nNOS und GFP (Abbildung 32, d & e).

Nahezu alle Zellen, die den MOL2.3-Rezeptor exprimieren, waren diesen Ergebnissen zufolge nitrerg. Außerdem zeigte sich, dass im SPG der neonatalen MOL2.3-IGITL Maus wesentlich weniger nitrerge MOL2.3-negative als -positive Zellen existieren.

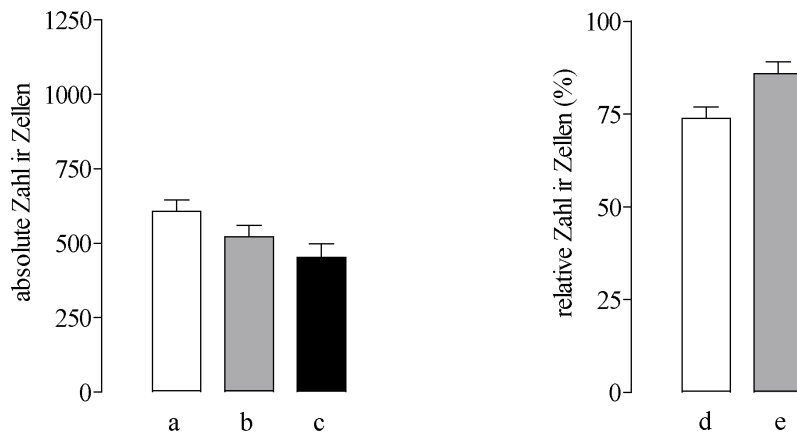


Abbildung 32 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) sowie deren Co-Lokalisation

Das linke Balkendiagramm zeigt die absolute Zahl GFP- (a) und nNOS- (b) immunreaktiver (ir), sowie doppelt markierter Zellen (c) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien).

Das rechte Diagramm demonstriert den prozentualen Anteil doppelt markierter Zellen bezogen auf die GFP- (d) und nNOS- (e) immunpositiven Zellen. Die Balken geben die arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien) an.

3.1.7 VACHT und nNOS

Um das Neurotransmitter-Coding der Zellen des *Ganglion sphenopalatinum* in Bezug auf deren Ausstattung mit cholinergen und nitrergen Neurotransmittern zu komplettieren, wurde in dieser Versuchsreihe untersucht, in welchem Maß VACHT und nNOS co-lokalisiert waren (Abbildung 28).

Die hier ermittelten Zellzahlen von durchschnittlich 823 ± 9 VACHT-immunreaktiven und 648 ± 15 nNOS-positiven Zellen pro Tier stimmen weitestgehend mit den Zahlen der vorherigen Versuche überein. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass 602 ± 14 Zellen pro Tier von beiden Antikörpern detektiert wurden (Abbildung 33, a-c). Von allen nNOS-positiven Zellen pro Tier waren 568 ± 17 Zellen pro Tier von VACHT-immunreaktiven synaptischen Endigungen umgeben. Bei den übrigen 81 ± 8 nNOS-ir Zellen gab es fluoreszenzmikroskopisch keinen Hinweis darauf, dass sie von vorgeschalteten Zellen cholinerg innerviert wurden (Daten nicht gezeigt).

Die prozentuale Verteilung der beiden Antigene sieht folgendermaßen aus: $73,1 \pm 1,7$ % der VACHT-positiven, also cholinergen Zellen, erwiesen sich gleichzeitig als

nitroerg, während fast alle nitroergen neuronalen Zellen VACHT co-exprimierten ($92,9 \pm 0,5 \%$) (Abbildung 33, d & e). Cholinerge Zellen projizierten zu $87,5 \pm 1,2 \%$ der nitroergen Zellen.

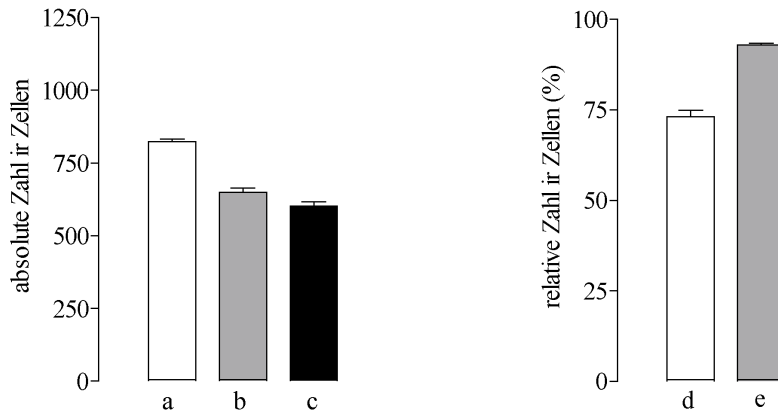


Abbildung 33 : Immunhistochemische Lokalisation von VACHT und nNOS, sowie deren Co-Lokalisation

Das linke Balkendiagramm zeigt die absolute Zahl VACHT- (a) und nNOS- (b) immunreaktiver (ir), sowie doppelt markierter Zellen (c) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien).

Das rechte Diagramm demonstriert den prozentualen Anteil doppelt markierter Zellen bezogen auf die VACHT- (d) und nNOS- (e) immunpositiven Zellen. Die Balken geben die arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M. von fünf Tieren (10 Ganglien) an.

3.1.8 GFP und PACAP

Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte in den Zellen des *Ganglion sphenopalatinum* außerdem das regulatorische Polypeptid PACAP nachgewiesen werden. In dieser Versuchsreihe erfolgte zwar keine Quantifizierung der Antigen-Expression, es konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass PACAP sowohl in MOL2.3-positiven wie auch –negativen Zellen exprimiert wurde (Abbildung 34).

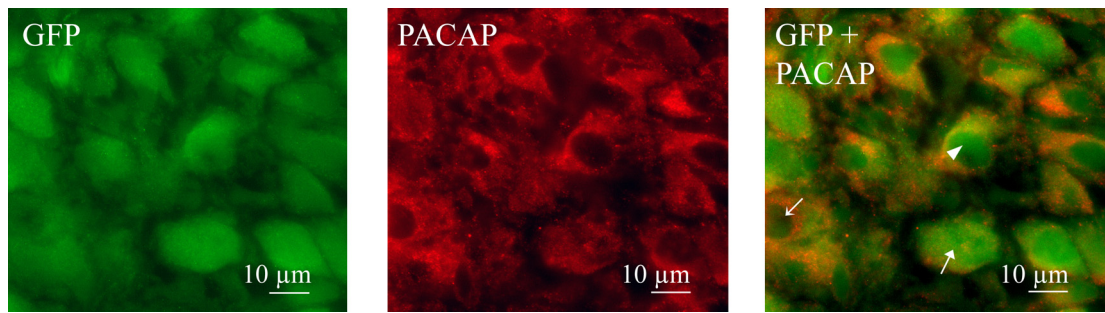


Abbildung 34 : Immunhistochemischer Nachweis von GFP und PACAP im SPG

Die linke Abbildung zeigt grün markierte, GFP-positive Zellen, die mittlere PACAP-immunreaktive Zellen. Auf dem rechten Bild ist die Überlagerung der PACAP- und GFP-positiven Signale zu sehen.

Die Pfeile in den Abbildungen der rechten Spalte weisen auf jeweils eindeutig immunreaktive Zellen hin (→ grün, → rot, ► doppelt markiert).

3.1.9 *GFP und SP*

Da das SPG sehr oft mit chronischer Migräneerkrankung beim Menschen in Zusammenhang gebracht wird, sollte abschließend immunhistochemisch untersucht werden, ob Substanz P (SP) in den MOL2.3-positiven Zellen co-exprimiert wird. Für SP wird postuliert, dass es besonders in Nervenfasern vorkommt, die der Schmerzwahrnehmung dienen (Tohyama and Takatsuji 1998).

Auch hier erfolgte lediglich der qualitative Nachweis, dass SP sowohl in GFP-immunreaktiven als auch –negativen Zellen lokalisiert werden konnte (Abbildung 35). Auf eine Quantifizierung wurde verzichtet.

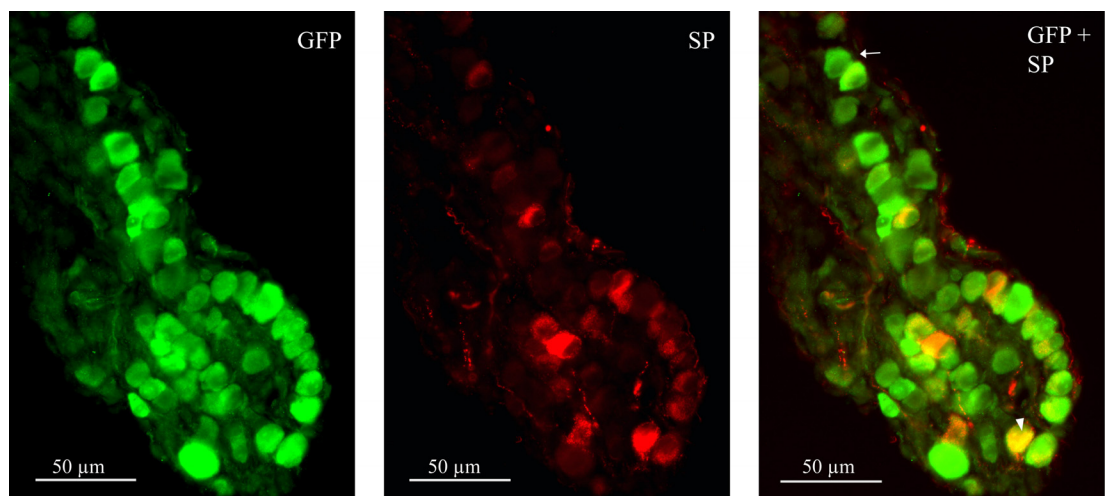


Abbildung 35 : Immunhistochemischer Nachweis von GFP und SP

Die linke Abbildung zeigt grün markierte, GFP-positive Zellen, die mittlere einzelne SP-immunreaktive Zellen. Auf dem rechten Bild ist die Überlagerung der SP-positiven und GFP-positiven Signale zu sehen.

Die Pfeile in den Abbildungen der rechten Spalte weisen auf jeweils eindeutig immunreaktive Zellen hin (➔ grün, ► doppelt markiert).

3.2 Zellkultur

In der primären neuronalen Zellkultur des *Ganglion sphenopalatinum* konnten im Durchlichtmikroskop sowohl große als auch kleine Zellen dargestellt werden. Die Zellen waren überwiegend abgerundet und ihre Zellmembran erschien regelmäßig. Zwischen den runden Zellen waren vereinzelt unregelmäßig geformte Zellen zu erkennen, welche die Präparation und/oder Dissoziation offensichtlich nicht ohne Zellmembranschäden überstanden haben.

Im Fluoreszenzmikroskop waren bei Anregung mit monochromatischem Licht einer entsprechenden Wellenlänge (EGFP; ARW 488 nm, EWL 510 nm) ebenfalls große und kleine, deutlich grün fluoreszierende Zellen sichtbar, welche eindeutig GFP- und somit auch MOL2.3-positiv waren. Neben diesen stark fluoreszierenden, GFP-positiven Zellen waren in allen Kulturen zusätzlich kleine Zellen mit deutlich schwächer ausgeprägten Fluoreszenzeigenschaften zu sehen. Bei diesen Zellen handelte es sich um sogenannte SIF-Zellen (SIF, *small intensiv fluorescent*) (Leblanc and Landis 1989) mit ausgeprägter Autofluoreszenz. Die Autofluoreszenz war deutlich schwächer ausgeprägt als die GFP-spezifische Fluoreszenz der MOL2.3-positiven Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass allgemein die GFP-Fluoreszenz die Autofluoreszenz überstrahlte. Weiterhin gab es Zellen beider Größenklassen, die keine Autofluoreszenz aufwiesen und nicht fluoreszierten, wenn sie mit Licht der GFP-anregenden Wellenlänge angeregt wurden. Diese Zellen waren eindeutig als GFP-negativ zu bezeichnen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sie das MOL2.3-Rezeptorprotein nicht exprimierten.

Die Zellen mit intakter Zellmembran ließen sich ausnahmslos mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen. Nach der 45-minütigen Inkubation mit Fura-2 Acetoxymethylester fluoreszierten die Zellen sowohl bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm als auch 380nm.

Im Laufe der Calcium-Imaging Versuche stellte sich heraus, dass der überwiegende Teil der großen, abgerundeten Zellen ein deutliches, Transmitter-induziertes Antwortverhalten zeigte, unabhängig von der Expression des MOL2.3-Rezeptors. In diesen Zellen konnte auch nach lange dauernden Versuchen (ca. 60 Minuten) noch eine beispielsweise Kalium-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ ausgelöst werden (z.B. Kapitel 3.3.2.3). Die kleinen Zellen dagegen schienen weniger responsiv zu sein. Dies spiegelte sich zum einen darin wider, dass der Anteil reagierender Zellen im Vergleich zu den großen Zellen deutlich geringer war; zum anderen war die Höhe der Änderung der Ratio nach Stimulation kleiner als bei den Zellen größeren Durchmessers. Auch hier fiel kein Unterschied zwischen MOL2.3-

positiven und -negativen Zellen auf. Die Zellen mit unregelmäßiger Zellmembran konnten mit keiner der getesteten Agenzien zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ angeregt werden.



Abbildung 36 : Fluoreszenzmikroskopische Darstellung MOL2.3-positiver Zellen in der Primärkultur (EGFP; ARW 488 nm, EWL 510 nm)

Die Fotos zeigen isolierte, dissoziierte Zellen (1 Stunde nach Dissoziation) der neuronalen Primärkultur des SPG. Die GFP-Fluoreszenz ist deutlich zu erkennen, ebenso wie der Größenunterschied zwischen großen und kleinen ganglionären Zellen.

3.3 Calcium-Imaging

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Calcium-Imaging Versuche zusammengefasst werden.

Die Zellen wurden zwischen einer und vier Stunden nach der Dissoziation untersucht; die Dauer der Versuche betrug 5-75 Minuten. Aus einer Zellkulturkammer konnten gleichzeitig 1-10 Zellen geimagt werden, wobei der Anteil MOL2.3-positiver bzw. -negativer Zellen von Präparation zu Präparation stark variierte.

3.3.1 Kalium

Eine erhöhte Konzentration an extrazellulärem Kalium (High-Kalium-Puffer, $[K^+]$ 100 mM; Stimulationsdauer 10 Sekunden) wurde in vielen Versuchen als Kontrollstimulus eingesetzt. Er diente dazu, die Vitalität der isolierten ganglionären Neurone nachzuweisen, welche auf Transmitterapplikation hin nicht mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagiert hatten. Zellen, die am Ende eines Versuchs nicht auf den K^+ -Stimulus reagierten, wurden als funktionseingeschränkt definiert und somit in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Abbildung 37A zeigt, dass 97,0 % der 67 untersuchten MOL2.3-positiven Zellen auf den K^+ -Stimulus mit einer Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio reagierten. Von den 30 untersuchten MOL2.3-negativen Zellen reagierten 96,7 % auf K^+ -Stimulation (Abbildung 37A, b).

Der Mittelwert der Ratioerhöhung lag bei den MOL2.3-positiven Zellen bei $0,54 \pm 0,04$, bei den MOL2.3-negativen Zellen bei $0,42 \pm 0,05$ (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.), wie das Balkendiagramm in Abbildung 37B zeigt. Diese Werte wichen nicht signifikant voneinander ab ($P > 0,05$).

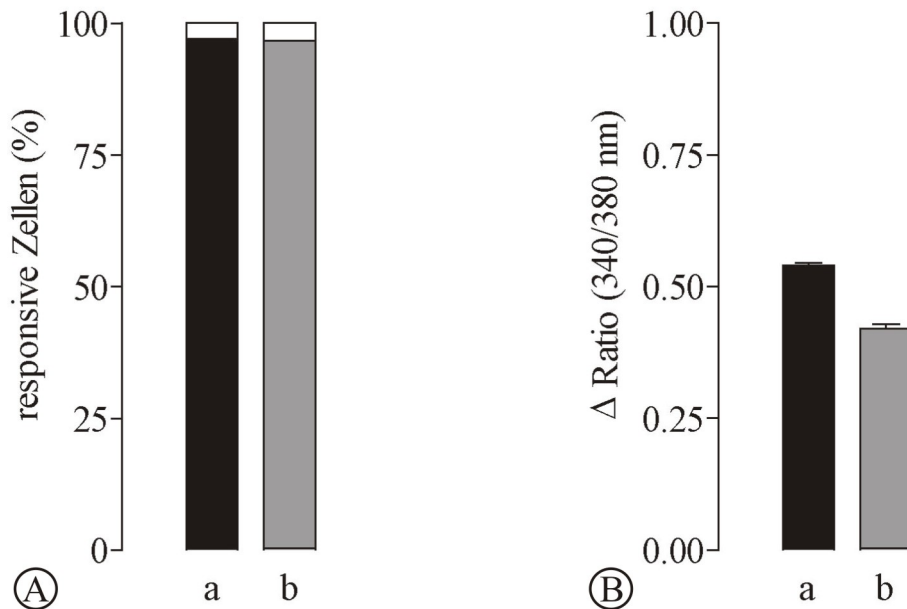


Abbildung 37 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem K^+

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver (a) ($n = 67$) und -negativer (b) ($n = 30$) Zellen nach Superfusionsstimulation mit K^+ in einer Konzentration von 10^{-1} M/l.

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden MOL2.3-positiven (a) ($n = 65$) und -negativen (b) ($n = 29$) Zellen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. wider.

Die Ratioänderungen der MOL2.3-positiven und -negativen Zellen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Abbildung 38 zeigt den Kurvenverlauf eines Versuchs, in dem eine MOL2.3-positive Zelle mit 100 mM K^+ im Superfusionspuffer stimuliert wurde. Die Ganglienzelle reagierte, wie es für Neurone typisch ist, mit einem steilen Anstieg der Fluoreszenz Ratio, welche nach dem Maximum steil wieder abfiel. Bei Superfusion MOL2.3-negativer Zellen zeigten sich vergleichbare Kurvenverläufe (Daten nicht gezeigt).

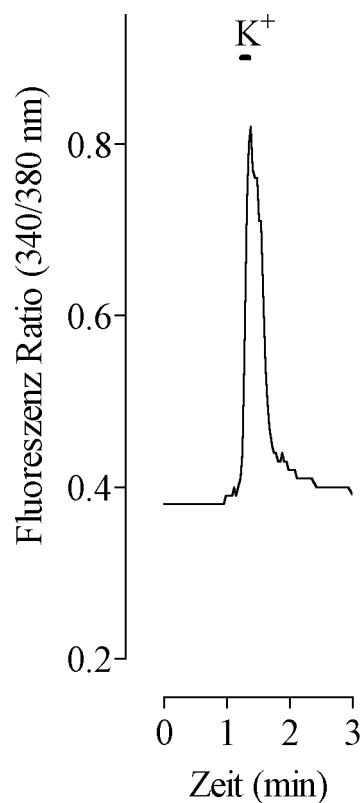


Abbildung 38 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit K^+ [100 mM/l] für 10 Sekunden

Charakteristisch ist der steile Anstieg der Ratio auf den Maximalwert. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 65$ Zellen.

3.3.2 Acetylcholin

Da es sich beim *Ganglion sphenopalatinum* wie bereits erwähnt um ein parasympathisches Ganglion handelt, sollte zunächst das Antwortverhalten sowohl der MOL2.3-positiven als auch der MOL2.3-negativen Zellen charakterisiert und miteinander verglichen werden.

3.3.2.1 Stimulation mit Acetylcholin

Die Stimulation der SPG-Neurone mit Acetylcholin in einer Konzentration von 10^{-4} M/l (2-3 min) führte nach Applikation mittels Perfusionspumpe bei 100 % der untersuchten MOL2.3-positiven Zellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ (Abbildung 39A, a) ($n = 173$). Nach Bolusapplikation konnte bei 99,1 % der untersuchten Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenz Ratio beobachtet werden (Abbildung 39A, b) ($n = 109$).

Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen erhöhte sich nach Applikation über die Pumpe um $0,51 \pm 0,02$ (Abbildung 39B, a), nach Bolusapplikation um $0,71 \pm 0,04$ (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) (Abbildung 39B, b) ($n = 108$), wobei sich die Bolusapplikation als hochsignifikant stärkerer Stimulus erwies ($2P \leq 0,001$).

Diese deutlich höhere Ratioänderung nach Bolusapplikation gegenüber der Applikation über die Pumpe lässt sich durch die niedrige Flussrate der Pumpe von 2 ml/min erklären. Die Acetylcholin-Konzentration in der Messkammer erhöhte sich nur langsam, wenn das ACh über die Pumpe in die Kammer gepumpt wurde. Wurde ACh als Bolus in die Kammer pipettiert, so stieg die ACh-Konzentration schlagartig auf den gewünschten Wert von 10^{-4} M/l an (vergleiche Kapitel 2.4.3.4). Dies bestätigen auch die Graphen in Abbildung 41. Die Kurvenverläufe zweier, mit ACh (10^{-4} M/l) stimulierter, MOL2.3-positiver Zellen zeigen, dass die Maxima der Fluoreszenz Ratio bei Bolusapplikation in Bezug auf den Stimulationsbeginn früher erreicht wurden als bei Applikation via Pumpe. Außerdem verdeutlichen die Graphen, dass die mittlere Ratioerhöhung bei ACh-Superfusion deutlich geringer ist als bei Applikation als Bolus.

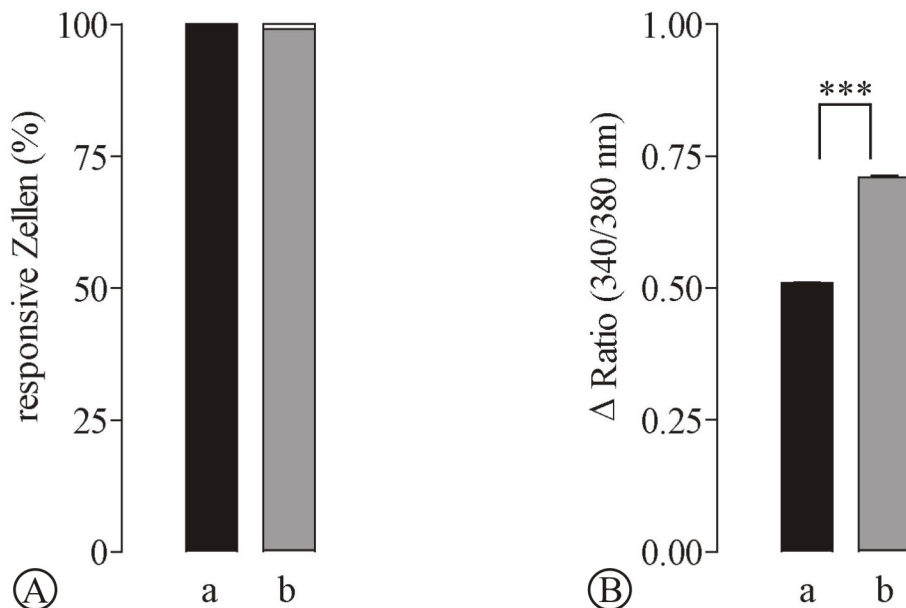


Abbildung 39 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin (ACh)

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh in einer Konzentration von 10^{-4} M/l über die Pumpe (a) ($n = 173$) bzw. nach Bolusapplikation (b) ($n = 109$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider. Balken

a zeigt die Ratioänderung nach ACh-Applikation über die Pumpe (n = 173), Balken b nach Applikation als Bolus (n = 108).

*** kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Von den untersuchten MOL2.3-negativen Zellen reagierten 89,1 % auf Stimulation mit Acetylcholin über die Pumpe (Abbildung 40A, a) (n = 110). Nach Bolusapplikation konnte bei 96,6 % der untersuchten Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenz Ratio beobachtet werden (Abbildung 40A, b) (n = 59).

Die mittlere Ratioänderung betrug nach Applikation über die Pumpe $0,45 \pm 0,03$ (Abbildung 40B, a) (n = 98), nach Bolusapplikation $0,62 \pm 0,05$ (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) (Abbildung 40B, b) (n = 57) ($2P \leq 0,001$). Eine vergleichende Analyse zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen zeigte, dass die ACh-Applikation über die Perfusionspumpe bei den MOL2.3-positiven Zellen zu etwas höheren Ratioänderungen führte als bei den -negativen Zellen ($2P \leq 0,05$), während sich bei Bolusapplikation kein Unterschied feststellen ließ.

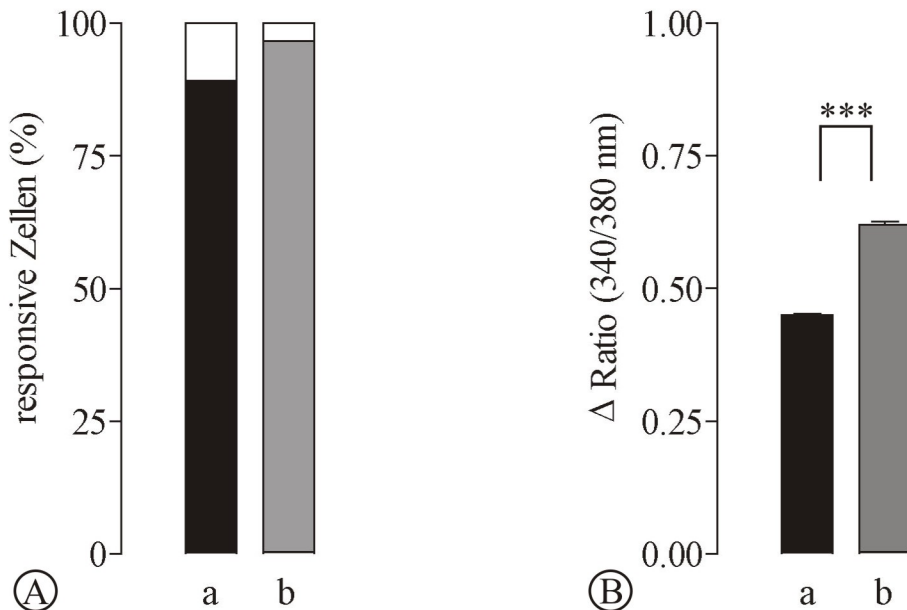


Abbildung 40 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) über die Pumpe (a) (n = 110) bzw. als Bolus (b) (n = 59).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider. Der schwarze Balken (a) zeigt die Ratioänderung nach ACh-Applikation über die Pumpe (n = 98), der graue Balken (b) nach Applikation als Bolus (n = 57).

*** kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

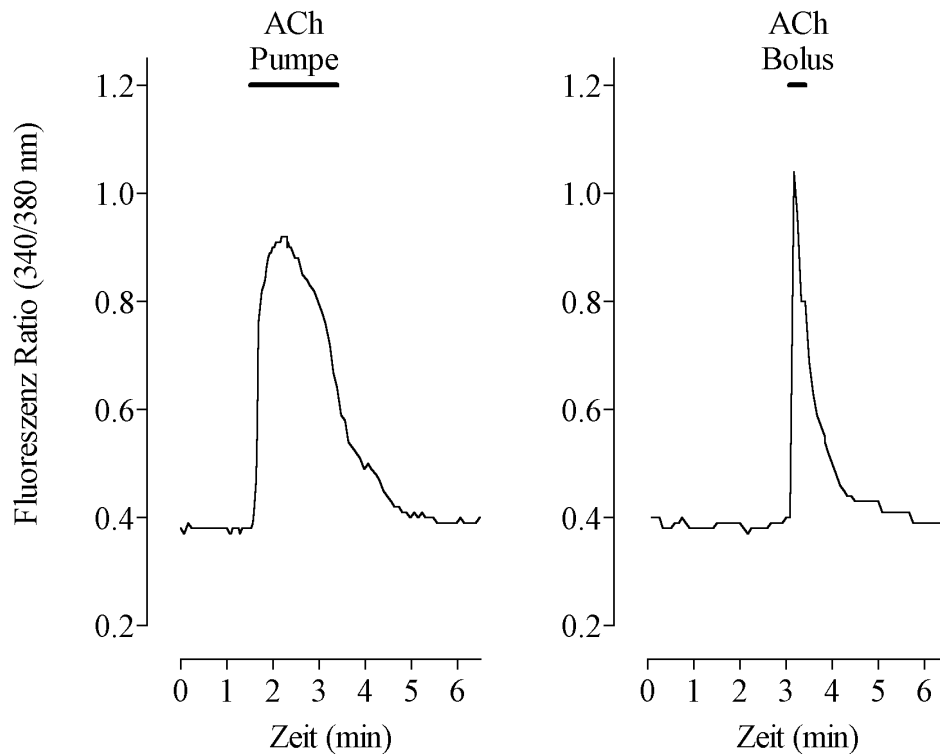


Abbildung 41 : 340/380 nm Ratio Signal einzelner MOL2.3-positiver Zellen des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin (10^{-4} M/l) über die Pumpe (links) bzw. als Bolus (rechts)

Die Kurvenverläufe sind repräsentativ für $n = 173$ (Pumpe) bzw. 109 Zellen (Bolus).

3.3.2.2 Dosisabhängigkeit

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Acetylcholin sowohl in MOL2.3-positiven als auch -negativen Zellen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bewirkt, sollte in der nächsten Versuchsreihe untersucht werden, ob die Acetylcholin-induzierte $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhung dosisabhängig ist.

Stimulation mit Acetylcholin in einer Konzentration von 10^{-6} M/l führte bei 37,5 % der untersuchten MOL2.3-positiven Zellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ (Abbildung 42A, a). Auf Stimulation mit Acetylcholin in Konzentrationen von 10^{-5} M/l (Abbildung 42A, b) und 10^{-4} M/l (Abbildung 42A, c) reagierten jeweils 100 % der untersuchten Zellen mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio ($n = 16$).

Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen erhöhte sich nach Superfusion mit ACh 10^{-6} M/l um $0,07 \pm 0,02$ ($n = 16$; $0,18 \pm 0,02$ bei den reagierenden Zellen, $n = 6$) (Abbildung 42B, a), mit ACh 10^{-5} M/l um $0,22 \pm 0,03$ (Abbildung 42B, b) und mit ACh 10^{-4} M/l um $0,34 \pm 0,04$ (Abbildung 42B, c) (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) ($n = 16$). Wie Abbildung 42B zeigt, unterscheiden sich die Änderungen der Ratio nach Stimulation mit ACh unterschiedlicher Konzentration hochsignifikant ($2P \leq 0,001$) voneinander.

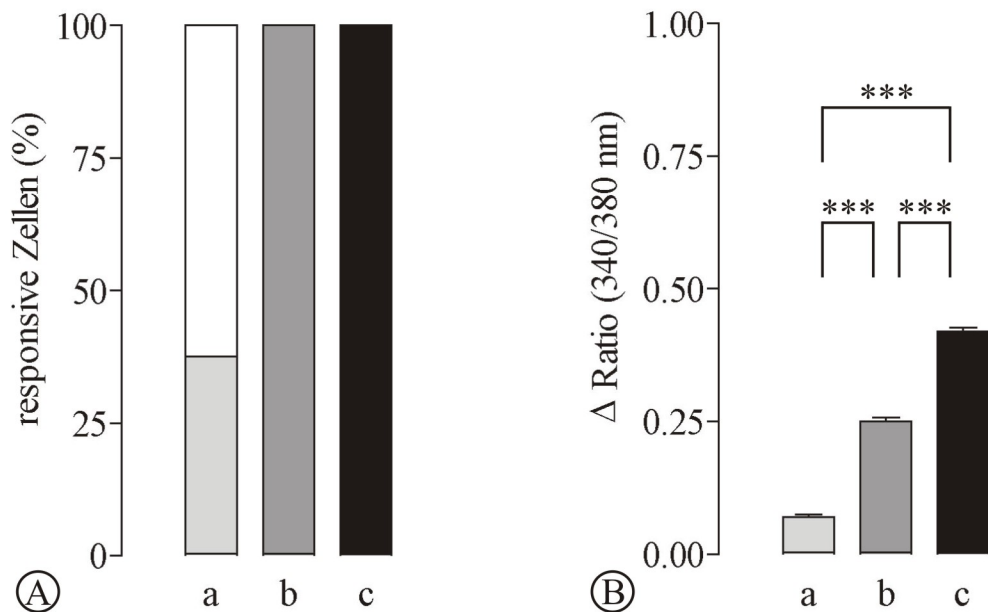


Abbildung 42 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin steigender Konzentration

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach sequentieller Stimulation mit ACh in Konzentrationen von 10^{-6} M/l (a), 10^{-5} M/l (b) und 10^{-4} M/l (c) ($n = 16$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen bei Zugabe von ACh in Konzentration von 10^{-6} M/l (a), 10^{-5} M/l (b) und 10^{-4} M/l (c) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 16$).

*** kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Auch die lag-Phasen zwischen dem Beginn der Stimulation und dem Beginn des Ratioanstiegs (t_2-t_1), dem Erreichen des Maximums (t_3-t_1) und dem Erreichen der basalen Ratiowerte (t_4-t_1) unterschieden sich bei sequentieller Stimulation mit ACh steigender Konzentrationen. So begann der Anstieg der Fluoreszenz Ratio umso

früher nach Beginn der Superfusion, je höher die Konzentration des ACh war. Das Maximum der Ratioänderung wurde bei den niedrigeren ACh-Konzentrationen (10^{-6} und 10^{-5} M/l) früher erreicht als bei Superfusion mit ACh in einer Konzentration von 10^{-4} M/l, was dadurch zu erklären ist, dass die Ratio sich auf umso größere Werte steigerte, je höher die Konzentration des eingesetzten ACh war. Auch die Dauer der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ war von der Konzentration des superfundierten ACh abhängig, so dass nach höheren Konzentrationen des applizierten ACh die Ratio-Basallinie später wieder erreicht wurde als nach niedrigeren Konzentrationen.

Tabelle 5: Dauer zwischen dem Beginn der Superfusion (t_1) und des Ratioanstiegs (t_2), dem Erreichen des Maximums (t_3) und der basalen Ratiowerte (t_4) bei Stimulation mit ACh verschiedener Konzentrationen

Finale [ACh] in der Messkammer	Dauer $t_2 - t_1$ (Sekunden)	Dauer $t_3 - t_1$ (Sekunden)	Dauer $t_4 - t_1$ (Sekunden)
10^{-6} M/l	10	32	197
10^{-5} M/l	7	29	220
10^{-4} M/l	3	48	245

In dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls neben MOL2.3-positiven auch MOL2.3-negative Zellen untersucht. Von den MOL2.3-negativen Zellen reagierten 36,4 % auf Stimulation mit Acetylcholin einer Konzentration von 10^{-6} M/l (Abbildung 43A, a). Auf Stimulation mit Acetylcholin einer Konzentration von 10^{-5} M/l (Abbildung 43A, b) und 10^{-4} M/l (Abbildung 43A, c) reagierten jeweils 100 % der untersuchten Zellen mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio ($n = 11$).

Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen erhöhte sich nach ACh 10^{-6} M/l um $0,07 \pm 0,02$ ($n = 11$; $0,15 \pm 0,02$ bei den reagierenden Zellen, $n = 4$) (Abbildung 43B, a), nach ACh 10^{-5} M/l um $0,25 \pm 0,03$ (Abbildung 43B, b) und nach ACh 10^{-4} M/l um $0,42 \pm 0,03$ (Abbildung 43B, c) (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) ($n = 11$). Auch hier sind die Unterschiede in der Ratioänderung signifikant.

Bei dieser Versuchsserie war kein signifikanter Unterschied zwischen den Ratioerhöhungen bei vergleichbarer Stimulation der MOL2.3-positiven und -negativen Zellen festzustellen ($2P > 0,05$). Beide Zellpopulationen reagierten vergleichbar dosisabhängig auf sequentielle Stimulationen mit ACh steigender Konzentrationen.

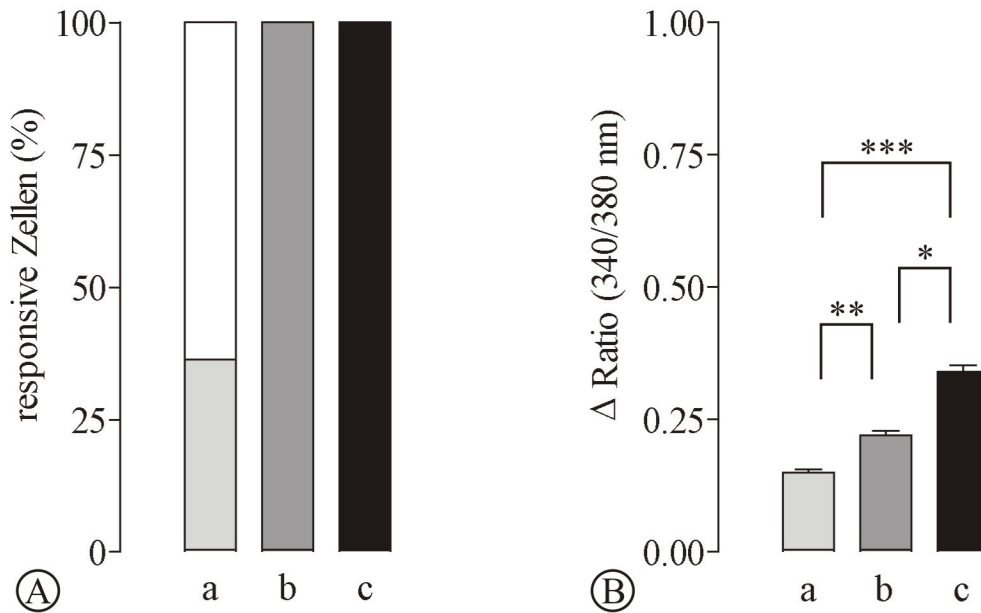


Abbildung 43 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin steigender Konzentration

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach sequentieller Stimulation mit ACh in Konzentrationen von 10^{-6} M/l (a), 10^{-5} M/l (b) und 10^{-4} M/l (c) (n = 11).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen bei Zugabe von ACh in Konzentration von 10^{-6} M/l (a), 10^{-5} M/l (b) und 10^{-4} M/l (c) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 11).

* kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* ($2P \leq 0,05$), ** ($2P \leq 0,01$) und *** ($2P \leq 0,001$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

In der folgenden Abbildung (Abbildung 44) ist der Original-Ratioverlauf eines Versuchs wiedergegeben, in dem eine MOL2.3-positive Zelle mit ACh in den Konzentrationen 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} M/l superfundiert wurde. Der Graph zeigt deutlich, dass die Ratio des untersuchten Neurons zunächst auf einer ruhigen Basallinie verlief und nach der ersten Stimulation mit ACh (10^{-6} M/l) deutlich anstieg. Nachdem die Ratio nach einiger Zeit die Basallinie wieder erreicht hatte, und die Zelle mit höher konzentriertem ACh (10^{-5} M/l) stimuliert wurde, stieg die Ratio auf einen höheren Wert an als bei der ersten Stimulation. Die dritte Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) bewirkte dann, dass die Ratio auf den höchsten Wert dieses Versuchs anstieg.

Da sich kein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellpopulationen feststellen ließ, soll hier auf die Darstellung eines Ratioverlauf einer MOL2.3-negativen Zelle verzichtet werden.

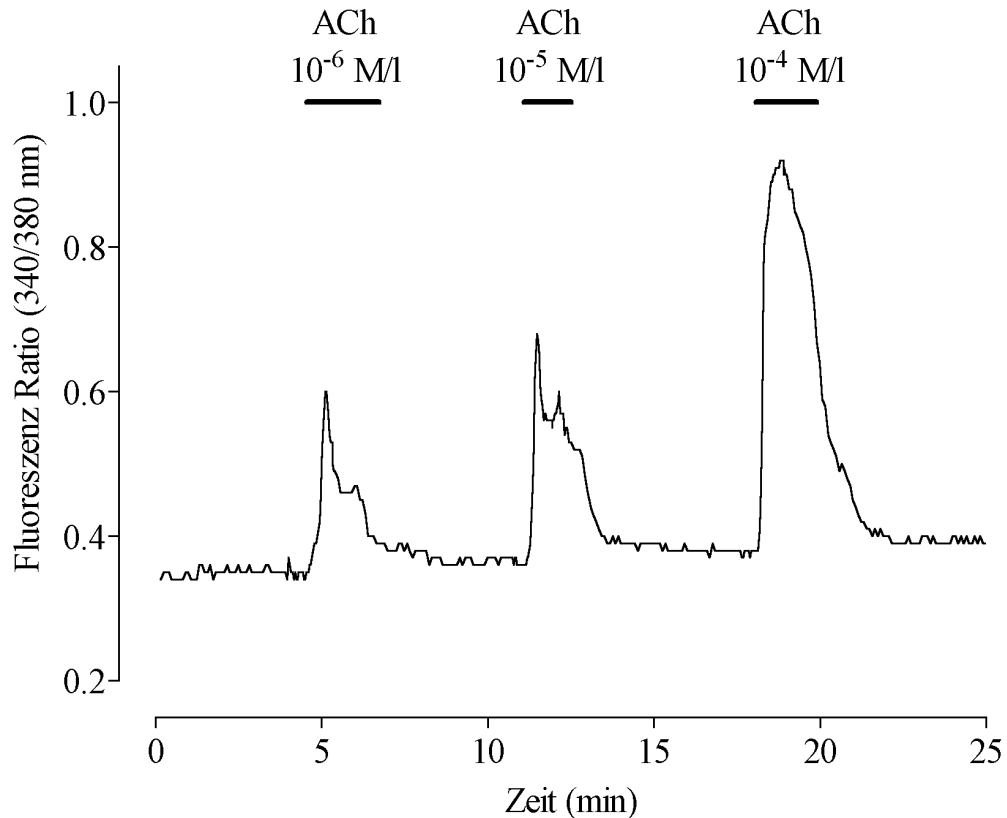


Abbildung 44 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin steigender Konzentration (10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} M/l)

Zu erkennen ist die deutliche Dosisabhängigkeit der Zellantworten. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 11$ Zellen.

3.3.2.3 Wiederholbarkeit

Als Voraussetzung für nachfolgende Versuchsreihen musste geklärt werden, ob repetitive Stimulationen mit Acetylcholin einer konstanten Konzentration bei den untersuchten Zellen zu einem Desensibilisierungsphänomen führten.

Zur Klärung dieser Frage wurden die Zellen sequentiell und bei vergleichbaren Zeitabständen mit Acetylcholin einer Konzentration von 10^{-4} M/l superfundiert. Bei 100 % der untersuchten MOL2.3-positiven Zellen konnte eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ nach allen drei Applikationen beobachtet werden (Abbildung 45A, a-c) ($n = 19$).

Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen erhöhte sich nach der ersten ACh-Applikation um $0,39 \pm 0,03$ (Abbildung 45B, a), nach der zweiten Applikation um $0,41 \pm 0,04$ (Abbildung 45B, b) und nach der dritten Applikation um $0,32 \pm 0,04$ (Abbildung 45B, c) (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) ($n = 19$). Die statistische Auswertung der Daten zeigte, dass diese Werte nicht signifikant voneinander abweichen ($2P > 0,05$).

Für die Zellen konnte also gezeigt werden, dass nach wiederholter Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) keine Desensibilisierung auftrat. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte für alle nachfolgenden Versuchsreihen mit Co-Applikation eines weiteren Neurotransmitters bzw. Subtyp-spezifischen Antagonisten/Agonisten oder Kanalblockers davon ausgegangen werden, dass eine, bezogen auf den ersten ACh-Stimulus, signifikant höhere oder niedrigere Ratioänderung der Zellen durch die Wirkung der zusätzlich applizierten Liganden bzw. Blocker zustande kommen sollte.

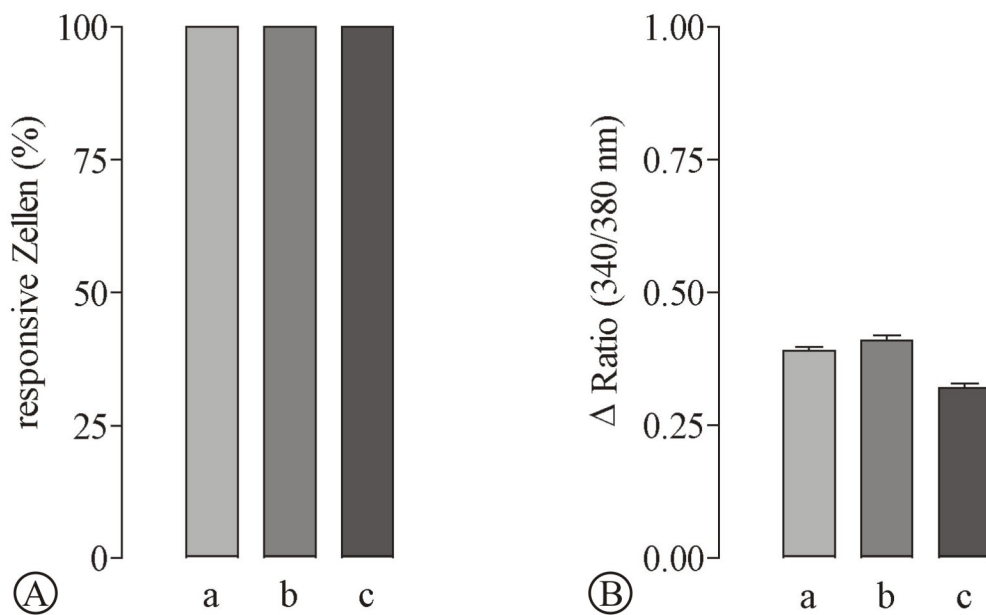


Abbildung 45 : Repetitive Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin gleicher Konzentration

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach dreifach wiederholter Stimulation mit ACh einer konstanten Konzentration von 10^{-4} M/l ($n = 19$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen bei repetitiver Applikation von ACh einer Konzentration von 10^{-4} M/l als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 19$).

Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Wie bei den MOL2.3-positiven Zellen, führte eine dreimalig wiederholte Stimulation mit Acetylcholin einer Konzentration von 10^{-4} M/l auch bei 100 % der untersuchten MOL2.3-negativen Zellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ (Abbildung 46A, a-c) ($n = 11$).

Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen erhöhte sich nach der ersten ACh-Applikation um $0,34 \pm 0,05$ (Abbildung 46B, a), nach der zweiten Applikation um $0,36 \pm 0,04$ (Abbildung 46B, b) und nach der dritten Applikation um

0,33 \pm 0,06 (Abbildung 46B, c) (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) (n = 11). Die gemessenen Werte wichen, wie bereits bei den MOL2.3-positiven Zellen zu beobachten war, nicht signifikant voneinander ab ($2P > 0,05$). Auch bei den MOL2.3-negativen Zellen kann also davon ausgegangen werden, dass bei Stimulation mit ACh kein Desensibilisierungsphänomen auftrat.

Wie schon im vorangegangenen Versuch, so war auch hier kein Unterschied zwischen MOL2.3-Rezeptor exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen zu erkennen ($2P > 0,5$).

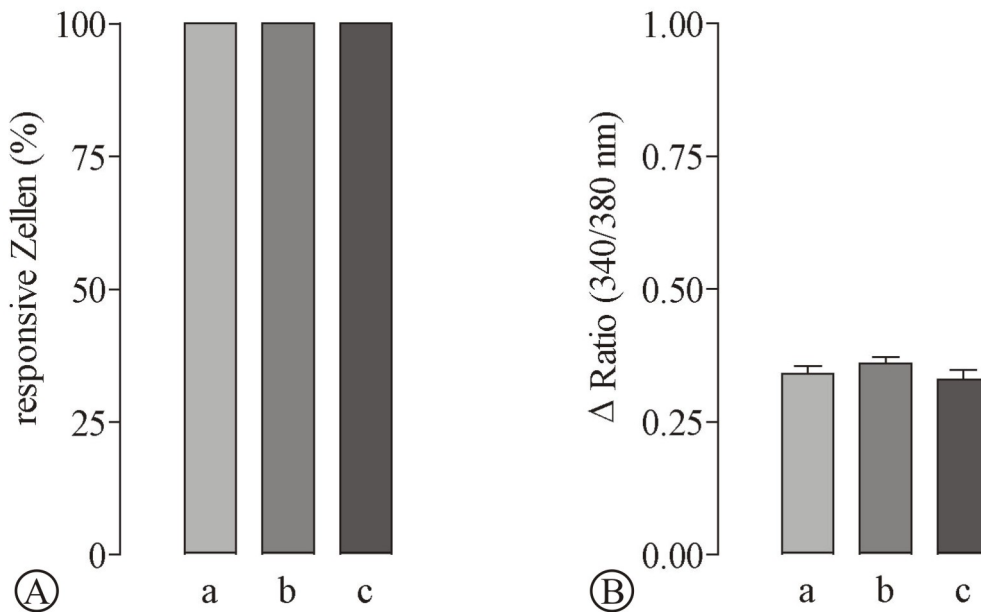


Abbildung 46 : Repetitive Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach dreifach wiederholter Stimulation mit ACh einer konstanten Konzentration von 10^{-4} M/l (n = 11).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen bei repetitiver Applikation von ACh einer Konzentration von 10^{-4} M/l als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 11).

Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Der Graph der folgenden Abbildung (Abbildung 47) zeigt den Kurvenverlauf eines Ratio Imaging Versuchs, bei welchem eine im Fluoreszenzmikroskop eindeutig als MOL2.3-positiv identifizierte Ganglienzelle wiederholt mit ACh (10^{-4} M/l) superfundiert wurde. Der Graph verdeutlicht die hinsichtlich *lag*-Phase, maximaler Ratio und Dauer des intrazellulären Calciumsignals vergleichbaren Antwortmuster des untersuchten SPG-Neurons.

Die MOL2.3-negativen Zellen zeigten vergleichbare Ratioverläufe (Daten nicht gezeigt).

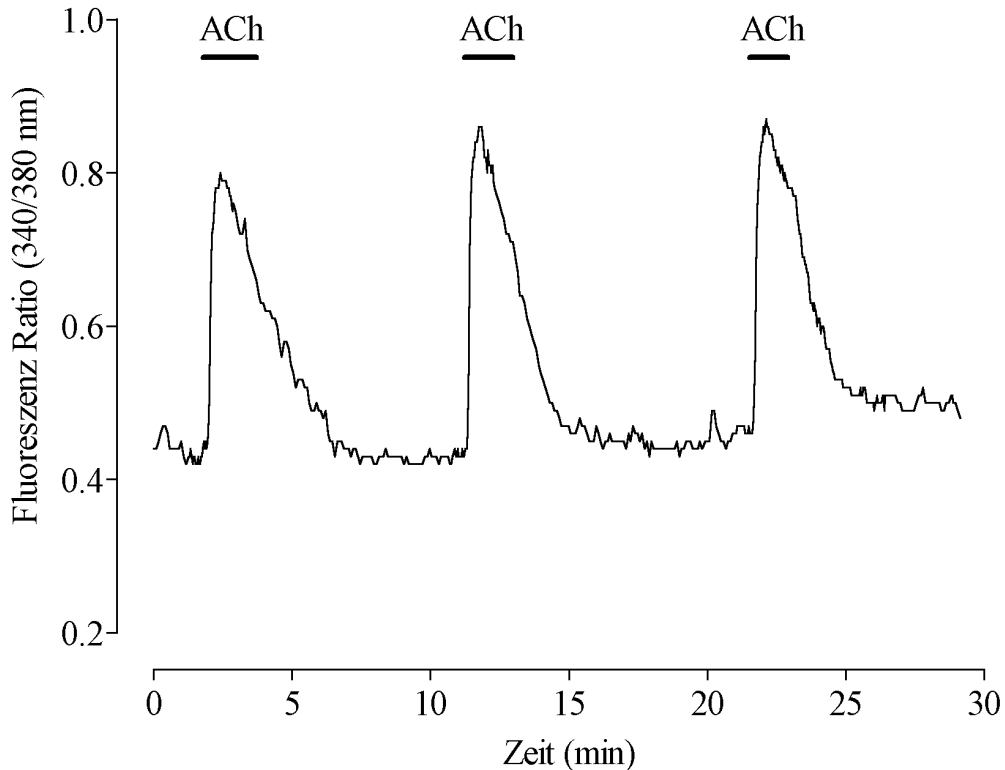


Abbildung 47 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach repetitiver Stimulation mit Acetylcholin einer konstanten Konzentration von 10^{-4} M/l

Auch nach wiederholter Stimulation der Zellen ist keine Desensibilisierung erkennbar. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 19$ Zellen.

3.3.2.4 Herkunft des Calciums nach Stimulation mit Acetylcholin

Nachdem in vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass Acetylcholin in den ganglionären Zellen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bewirkt, stellte sich nun die Frage, ob die Calciumionen von extrazellulär oder aus intrazellulären Speichern stammten.

Alle 40 untersuchten Zellen reagierten auf die Zugabe von ACh (10^{-4} M/l) mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio um durchschnittlich $0,40 \pm 0,03$ (Abbildung 48A & B, a). Nach Austausch des Calcium-haltigen (Ca^{2+} 1 mM/l) gegen einen Ca^{2+} -freien, EGTA-haltigen Messpuffer wurden die Zellen erneut mit ACh superfundiert. Lediglich bei 2 Zellen (5 %) konnte ein Anstieg der Fluoreszenz Ratio verzeichnet werden (Abbildung 48A, b). Der gemittelte Anstieg aller Zellen lag bei $0,02 \pm 0,01$

(n = 40; $0,31 \pm 0,12$ bei den reagierenden Zellen, n = 2) (Abbildung 48B, b). Die dritte Stimulation mit ACh, nach Austausch des Ca^{2+} -freien Puffers gegen den Ca^{2+} -haltigen bewirkte wieder einen Ratioanstieg bei 100 % der Zellen um $0,38 \pm 0,03$ (Abbildung 48A & B, c).

Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ basierte also eindeutig auf einem Einstrom extrazellulären Calciums ins Zytosol der Zellen.

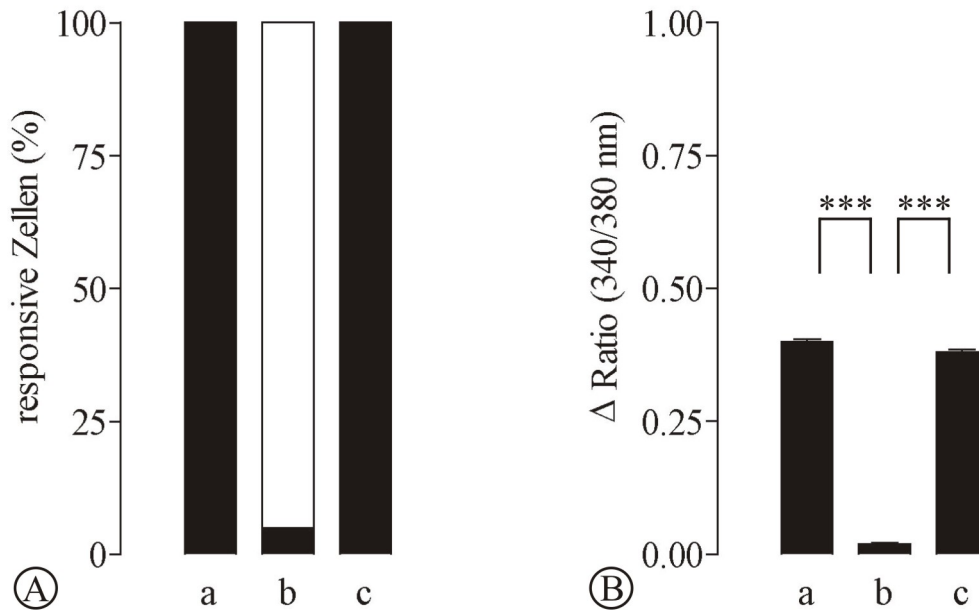


Abbildung 48 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin bei An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh bei Anwesenheit von extrazellulärem Calcium (a), bei Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}_{\text{ez}}$ (b) und einem ACh-Kontrollstimulus bei Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}_{\text{ez}}$ (c) (n = 40). ACh wurde jeweils in einer Konzentration von 10^{-4} M/l eingesetzt.

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach den oben genannten Applikationen als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (a-c) (n = 40).

*** kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Von den 16 untersuchten MOL2.3-negativen Zellen reagierten 81,3 % auf die Zugabe von ACh (10^{-4} M/l) (Abbildung 49A, a). Die Erhöhung der Fluoreszenz Ratio betrug durchschnittlich $0,30 \pm 0,09$ (n = 16; $0,37 \pm 0,09$ bei den reagierenden Zellen, n = 13) (Abbildung 49B, a). Durch ACh-Stimulation bei Abwesenheit extrazellulären Calciums konnte bei 75 % der Zellen kein Anstieg der Fluoreszenz

Ratio beobachtet werden. Der Ratioanstieg lag im Mittel aller Zellen bei $0,09 \pm 0,04$ ($n = 16$; $0,34 \pm 0,08$ bei den reagierenden Zellen, $n = 4$) (Abbildung 49A & B, b). Der finale Kontrollstimulus mit ACh nach Austausch des Ca^{2+} -freien Puffers gegen den Ca^{2+} -haltigen konnte einen Ratioanstieg bei 100 % der Zellen um $0,33 \pm 0,08$ auslösen (Abbildung 49A & B, c). Auch hier sind die Ratioänderungen nach Stimulation mit ACh bei Anwesenheit extrazellulären Calciums signifikant höher als ohne Calcium im Extrazellulärraum.

Wie schon bei alleiniger Applikation von ACh über die Pumpe zu beobachten war, stieg die Fluoreszenz Ratio der MOL2.3-positiven Zellen bei der ersten Stimulation auf signifikant höhere Werte als bei den –negativen Zellen ($2P \leq 0,01$). Bei den beiden folgenden Stimulationen ließ sich statistisch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermitteln ($2P > 0,05$).

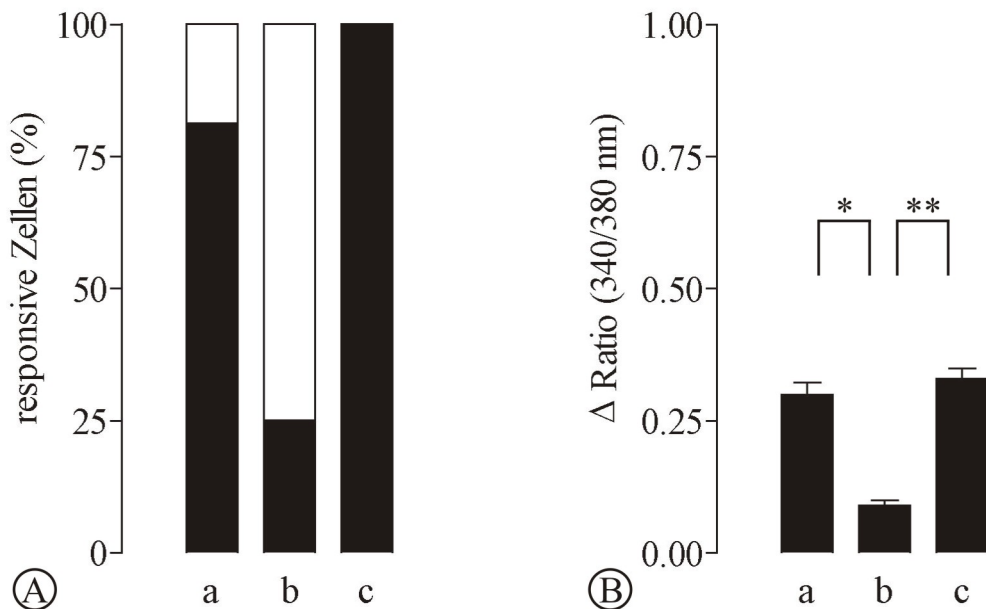


Abbildung 49 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin bei An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh bei Anwesenheit von extrazellulärem Calcium (a), bei Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}_{\text{ez}}$ (b) und einem Kontrollstimulus bei Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}_{\text{ez}}$ (c) ($n = 16$). ACh wurde jeweils in einer Konzentration von 10^{-4} M/l eingesetzt.

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach den oben genannten Applikationen als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 16$).

* kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* ($2P \leq 0,05$), ** ($2P \leq 0,01$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Das Calcium-Imaging Diagramm in Abbildung 50 zeigt, dass die Ratio-Basallinie der Zelle nach Austausch des 1 mM/l Calcium-haltigen Puffers gegen den Calcium-freien deutlich weniger schwankte und langsam auf niedrigere Werte absank. Erneute Superfusion mit Calcium-haltigem Puffer bewirkte das Ansteigen der basalen $[Ca^{2+}]_{iz}$, welche auch wieder stärker schwankte als bei Abwesenheit extrazellulären Calciums. Auch dies liefert einen Hinweis darauf, dass aus dem Extrazellulärraum stammendes Calciums eine große Bedeutung für die Zellfunktion hat.

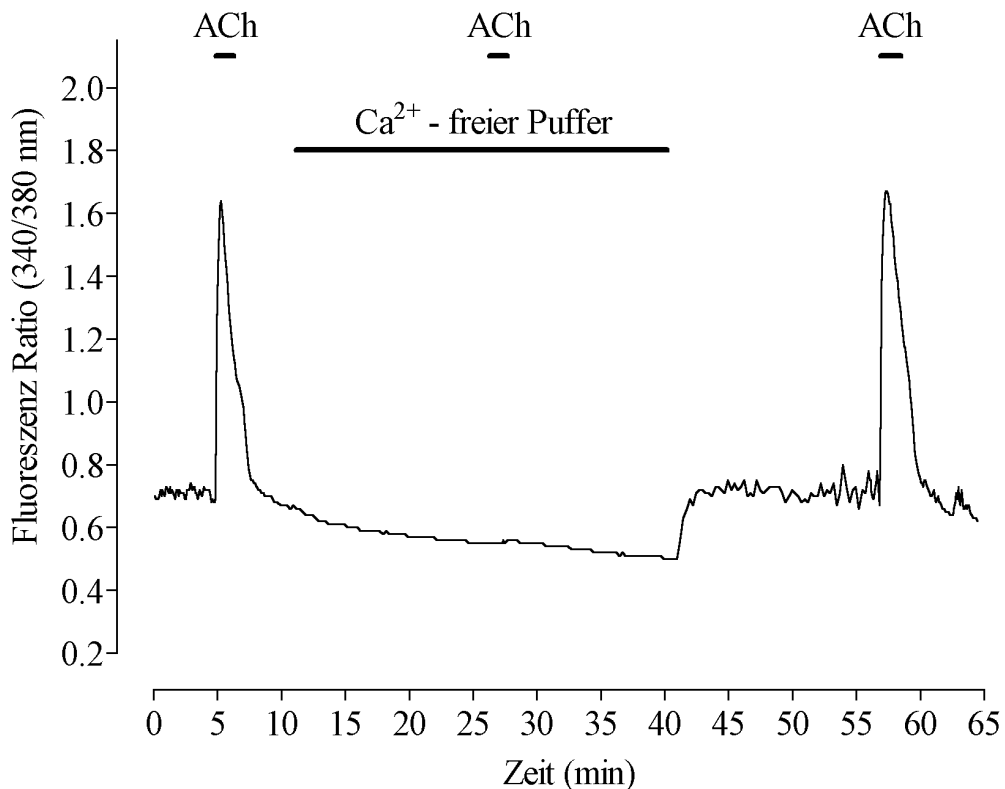


Abbildung 50 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des Ganglion sphenopalatinum nach Stimulation mit Acetylcholin bei An- und Abwesenheit extrazellulären Calciums

Im Gegensatz zu der deutlichen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit Acetylcholin (10^{-4} M/l) in Ca^{2+} -haltigem Puffer konnte nach Austausch des Ca^{2+} -haltigen gegen einen Ca^{2+} -freien Puffer kein Anstieg mehr beobachtet werden. Nach erneuter Superfusion mit Ca^{2+} -haltigem Puffer war der Ratio-Peak reproduzierbar. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 40$ Zellen.

3.3.2.5 Nicotinerger/muscarinerger Acetylcholin-Rezeptor Subtyp

Wie bereits erwähnt, unterscheidet man innerhalb der Gruppe der Acetylcholin-Rezeptoren muscarinerge und nicotinerge Rezeptorsubtypen. Durch Stimulation der Zellen mit Rezeptorsubtyp-spezifischen Agonisten erfolgte eine detailliertere Charakterisierung der Acetylcholin-vermittelten Signaltransduktion.

100 % der MOL2.3-positiven Zellen, welche in dieser Versuchsreihe eingesetzt wurden, reagierten auf den ersten ACh-Stimulus (10^{-4} M/l) mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ (Abbildung 51A, a) ($n = 14$). Die mittlere Ratioerhöhung betrug $0,53 \pm 0,06$ (Abbildung 51B, a). Ebenfalls bei allen getesteten Zellen konnte nach Stimulation mit dem nicotinergen Agonisten DMPP (10^{-5} M/l) ein Ratioanstieg von durchschnittlich $0,45 \pm 0,05$ verzeichnet werden (Abbildung 51A & B, b). Im Gegensatz dazu konnte die Superfusion des muscarinergen Agonisten Bethanechol in einer Konzentration von 10^{-5} M/l nur bei 28,6 % der Zellen eine $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhung bewirken (Abbildung 51A, c). Auch lag die Ratioerhöhung mit $0,04 \pm 0,02$ ($n = 14$; $0,12 \pm 0,00$ bei den reagierenden Zellen, $n = 4$) deutlich unterhalb der bei Stimulation mit ACh und DMPP (Abbildung 51B, c). Der abschließende ACh-Stimulus (10^{-4} M/l) führte wiederum bei allen Zellen zu einer deutlich messbaren Änderung der Fluoreszenz Ratio um $0,45 \pm 0,05$ (Abbildung 51A & B, d).

MOL2.3-positiven Zellen exprimieren diesen Ergebnissen zufolge ausschließlich nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR). In den Zellmembranen einiger Zellen fanden sich möglicherweise neben den nicotinergen Rezeptoren zusätzlich Rezeptoren, welche auf Stimulation mit dem muscarinergen Agonisten Bethanechol reagiert haben. Dies könnte auf eine mögliche, limitierte Expression muscarinerger AChR hinweisen, oder aber durch eine Cross-Reaktivität von Bethanechol mit nicotinergen AChR bedingt sein. Jede Zelle, die auf Bethanechol reagiert hat, hat auch auf DMPP reagiert. Es ist also davon auszugehen, dass keine MOL2.3-positive Zelle des SPG ausschließlich muscarinerge AChR exprimiert.

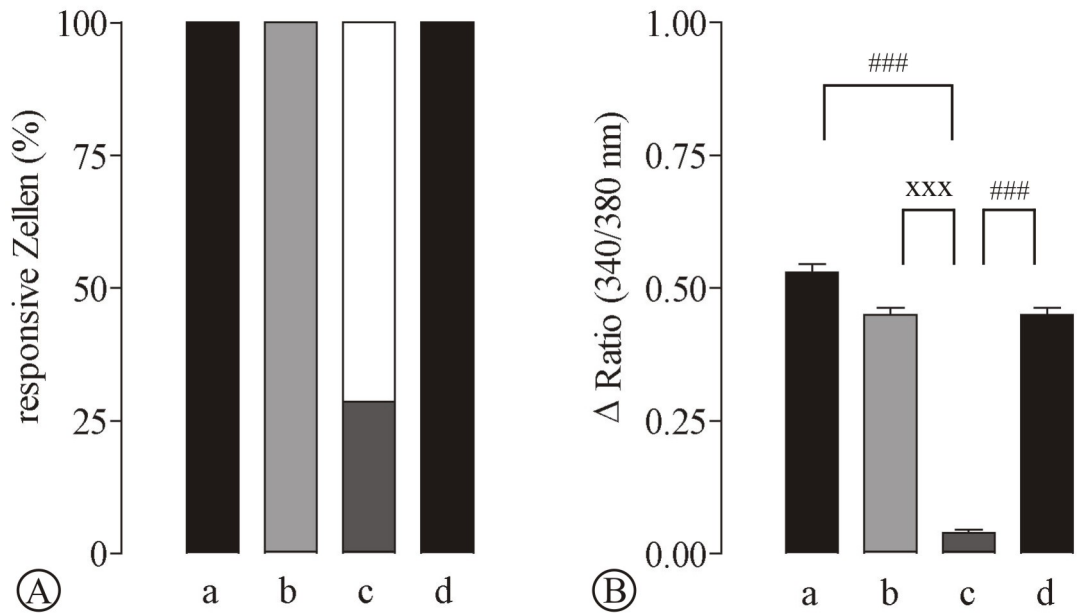


Abbildung 51 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin, DMPP und Bethanechol

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), DMPP (10^{-5} M/l) (b), Bethanechol (10^{-5} M/l) (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (10^{-4} M/l) (d) ($n = 14$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), DMPP (10^{-5} M/l) (b), Bethanechol (10^{-5} M/l) (c) und ACh (10^{-4} M/l) (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 14$).

/ xxx kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

In denselben Versuchsreihen wurden auch die Reaktionen MOL2.3-negativer Zellen gemessen. Dabei ergaben sich folgende Werte: Auf den ersten ACh-Stimulus (10^{-4} M/l) antworteten 100 % der untersuchten Zellen ($n = 13$) mit einer Ratioerhöhung von $0,45 \pm 0,06$ (Abbildung 52A & B, a). Ebenfalls alle Zellen reagierten mit einer Ratioerhöhung von $0,35 \pm 0,06$ auf Stimulation mit DMPP (10^{-5} M/l) (Abbildung 52A & B, b), dagegen nur 23 % auf Bethanechol (10^{-5} M/l) (Abbildung 52A, c). Hier betrug die durchschnittliche Änderung der Fluoreszenz Ratio $0,03 \pm 0,02$ ($n = 13$; $0,13 \pm 0,02$ bei den reagierenden Zellen, $n = 3$) (Abbildung 52B, c). Der Kontrollstimulus mit ACh (10^{-4} M/l) konnte die Ratio von 100 % der ausgewerteten Zellen um $0,38 \pm 0,05$ erhöhen (Abbildung 52A & B, a-d).

Bei den MOL2.3-negativen Zellen spiegelt sich ein ähnliches Bild wider wie schon bei den MOL2.3-positiven: Alle untersuchten Zellen exprimierten nicotinerge Acetylcholinrezeptoren. Einige dieser Zellen co-exprimierten möglicherweise

muscarinerge Rezeptoren, wohingegen keine Zelle gefunden wurde, die ausschließlich auf muscarinerge Stimulation reagierte. Auch bei der Höhe der Ratioanstiege ließ sich statistisch kein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen errechnen ($2P > 0,05$).

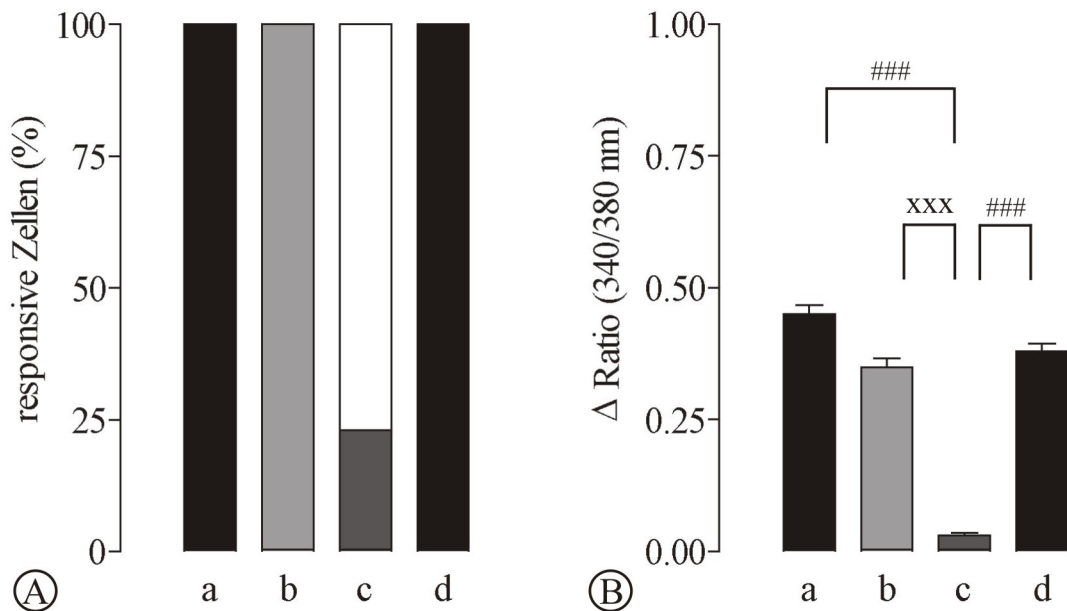


Abbildung 52 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin, DMPP und Bethanechol

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), DMPP (10^{-5} M/l) (b), Bethanechol (10^{-5} M/l) (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (10^{-4} M/l) (d) ($n = 13$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), DMPP (10^{-5} M/l) (b), Bethanechol (10^{-5} M/l) (c) und ACh (10^{-4} M/l) (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 13$).

/ xxx kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Alle Zellen dieser Versuchsreihe wurden jeweils am Anfang und am Ende des Versuchs mit ACh (10^{-4} M/l) stimuliert. Die cholinergen Agonisten wurden so appliziert, dass DMPP und Bethanechol randomisiert alternierend als zweiter Stimulus eingesetzt wurden. So konnte im Verlauf der Versuche deutlich gezeigt werden, dass die vorherige Applikation des einen Agonisten keinen Einfluss auf die Wirkung des zweiten Agonisten hatte. In Abbildung 53 ist ein Ratioverlauf eines Experiments gezeigt, in welchem die MOL2.3-positive Zelle zuerst mit dem muscarinergen Agonisten Bethanechol superfundiert wurde, und danach mit einer

deutlichen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf nicotinerge Stimulation mit DMPP reagierte.

Da zwischen den MOL2.3-positiven und –negativen Zellen statistisch keine Unterschiede zu ermitteln waren, wird auch hier kein Diagramm für MOL2.3-negative Zellen gezeigt.

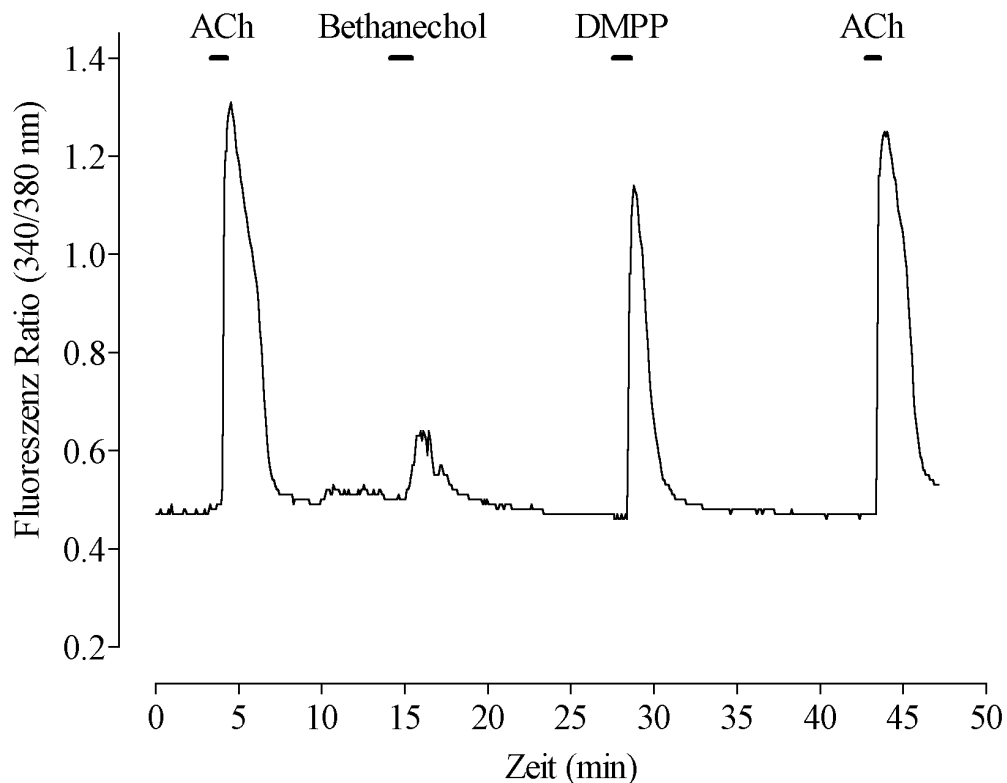


Abbildung 53 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin und cholinergen Agonisten

Nach Stimulation mit Acetylcholin (10^{-4} M/l), dem nicotinergen Agonisten DMPP (10^{-5} M/l) und einem ACh-Kontrollstimulus (10^{-4} M/l) wurden signifikant größere Ratioänderung gemessen als nach Stimulation mit dem muscarineren Agonisten Bethanechol (10^{-5} M/l). Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 4$ Zellen.

3.3.2.6 Nicotinerge Rezeptorsubtypisierung

3.3.2.6.1 Homomere $\alpha 7$ nAChR und MLA

Bislang konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl MOL2.3-positive als auch negative Zellen nAChR exprimieren. Wie in Kapitel 2.4.3.4.2.4 beschrieben, sind nAChR aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Mit Hilfe der

spezifischen nAChR Blocker MLA und ω -Conotoxin MVIIC sollte genauer bestimmt werden, aus welchen Untereinheiten der nAChR der Zellen des SPG zusammengesetzt ist, bzw. ob in den Zellen verschiedene nAChR exprimiert werden.

12 Zellen wurden in einer Versuchsreihe eingesetzt, in der die Zellen mit MLA superfundiert wurden. MLA blockiert selektiv homomere $\alpha 7$ nAChR.

Bei allen 12 Zellen stieg nach einer ersten ACh-Applikation (10^{-4} M/l) die Fluoreszenz-Ratio um durchschnittlich $0,78 \pm 0,11$ (Abbildung 54A & B, a). Bei keiner Zelle war nach Zugabe von MLA (10^{-5} M/l) alleine eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ zu beobachten (Abbildung 54A, b). Die mittlere Ratioänderung war demzufolge nicht quantifizierbar (Abbildung 54B, b). Auf Co-Stimulation mit MLA und ACh reagierten 25 % der untersuchten Zellen überhaupt nicht; die mittlere Ratioerhöhung der responsiven Zellen war mit $0,23 \pm 0,05$ ($n = 12$; $0,31 \pm 0,03$ bei den reagierenden Zellen, $n = 9$) signifikant geringer war als bei der ersten Stimulation mit ACh ($2P \leq 0,001$) (Abbildung 54A & B, c). Der den Versuch abschließende ACh-Kontrollstimulus löste wieder bei 100 % der Zellen einen Ratio-Anstieg aus. Dieser war mit $0,65 \pm 0,10$ wiederum signifikant höher als der Ratio-Peak nach Acetylcholin Co-Applikation mit MLA ($2P \leq 0,01$) (Abbildung 54A & B, d). Gegenüber dem ersten ACh-Stimulus bestand kein signifikanter Unterschied ($2P > 0,05$).

In etwa $\frac{3}{4}$ aller Zellen des SPG, welche den MOL2.3-Rezeptor exprimieren, sind diesen Daten zufolge homomere $\alpha 7$ nAChR lokalisiert. Diese konnten reversibel durch MLA gehemmt werden. Da allerdings die Zellantworten nach Blockade der $\alpha 7$ nAChR nicht vollständig unterblieben, ist davon auszugehen, dass in den Zellen zusätzlich nAChR-Subtypen vorkommen, die selbst als „*port of entry*“ für extrazelluläres Calcium dienen, oder aber sekundär zur Öffnung z.B. spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Plasmamembran der SPG-Neurone führen.

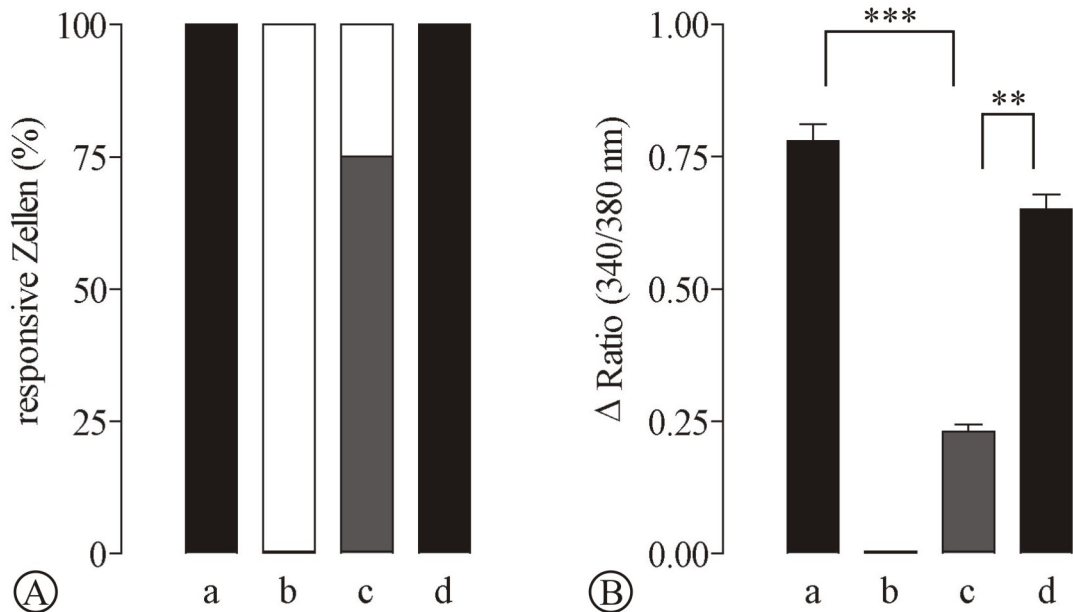


Abbildung 54 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und MLA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), MLA (10^{-5} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit MLA (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 12$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (a), MLA (b), ACh nach Inkubation mit MLA (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 12$).

* / # / x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (** ($2P \leq 0,01$), *** / #### / xxx ($2P \leq 0,001$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Im Laufe der Versuche konnten die Ratio-Verläufe von 11 MOL2.3-negativen Zellen ausgewertet werden. Alle Zellen zeigten nach der ersten Applikation von ACh (10^{-4} M/l) einen mittleren Ratio-Anstieg von $0,60 \pm 0,08$ (Abbildung 55A & B, a). Bei lediglich einer der untersuchten Zellen (9,1 %) konnte die alleinige Zugabe von MLA (10^{-5} M/l) in die Perfusionskammer eine Erhöhung der Ratio von $0,02 \pm 0,02$ ($n = 11$; $0,25$ bei der reagierenden Zelle, $n = 1$) auslösen (Abbildung 55A & B, b). Applikation von ACh am Ende einer Inkubation mit MLA bewirkte bei etwa der Hälfte aller Zellen einen Einstrom von Calcium (54,6 %) (Abbildung 55A, c). Die durchschnittliche Ratioänderung betrug $0,11 \pm 0,04$ ($n = 11$; $0,15 \pm 0,04$ bei den reagierenden Zellen, $n = 6$), und war damit signifikant niedriger als die Ratioänderung nach alleiniger ACh-Applikation ($2P \leq 0,001$) (Abbildung 55B, c). Auf den Kontrollstimulus mit ACh reagierten am Ende des jeweiligen Versuchs wieder alle 11 Zellen mit einer Änderung der Fluoreszenz-Ratio von $0,44 \pm 0,07$

(Abbildung 55A & B, d). Diese Ratioänderung wiederum war signifikant höher als diejenige nach Co-Stimulation mit MLA ($2P \leq 0,001$) und es ließ sich statistisch kein Unterschied in Bezug auf die erste ACh-Applikation errechnen ($2P > 0,05$).

Auch die MOL2.3-negativen Zellen des Ganglions exprimieren demzufolge funktionelle, homomere $\alpha 7$ nAChR, welche reversibel durch MLA hemmbar sind. Auch in den MOL2.3-negativen Zellen ist der $\alpha 7$ nAChR nicht der einzige Weg für Calcium, in die Zelle zu gelangen.

Dieser $\alpha 7$ nAChR-Blocker führte bei den beiden unterschiedlichen Zellpopulationen (MOL2.3-positiv und -negativ) zu keinen unterschiedlichen Ergebnissen ($2P > 0,05$).

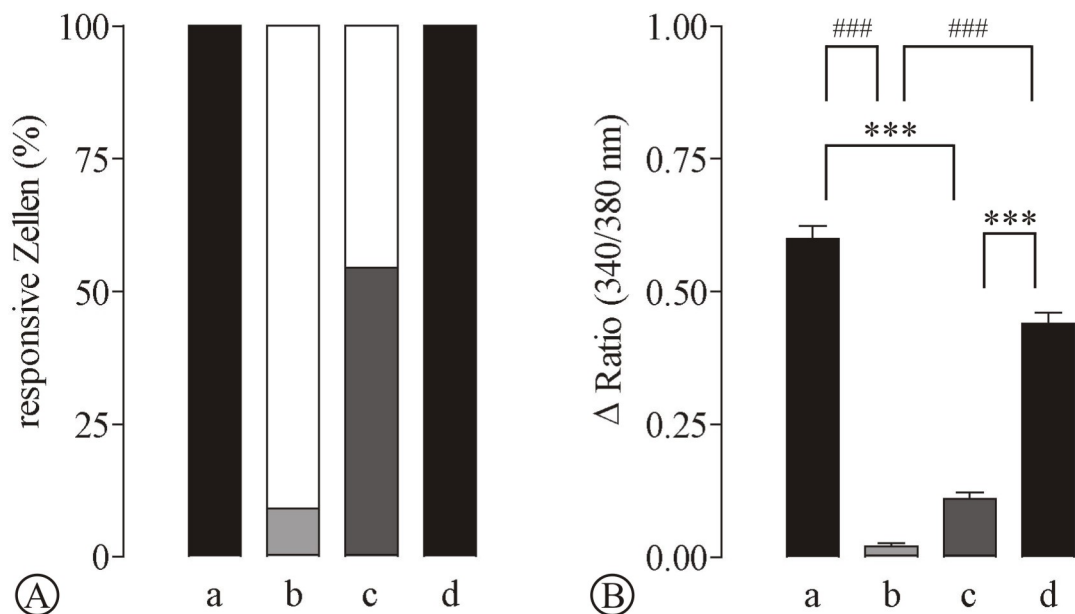


Abbildung 55 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und MLA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (a), MLA (b), ACh nach Inkubation mit MLA (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 11$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (a), MLA (b), ACh nach Inkubation mit MLA (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 11$).

*** / ### kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Der Graph in Abbildung 56 zeigt den Ablauf eines der oben beschriebenen Versuche. Es ist deutlich erkennbar, dass die Fluoreszenz Ratio nach der ersten und

letzten Stimulation, jeweils mit ACh einer Konzentration von 10^{-4} M/l, auf etwa gleiche Werte anstieg. Die alleinige Superfusion mit MLA hat nur bei sehr wenigen Zellen eine geringe Schwankung der Ratio-Basallinie ausgelöst; bei der Zelle in diesem Versuch blieb die Basallinie konstant. Um die homomeren $\alpha 7$ nAChR vor der zweiten ACh-Applikation zu blockieren, wurden die Zellen zunächst für 2 Minuten mit MLA inkubiert. Superfusions-Stimulation der in Primärkultur gehaltenen Neurone des SPG mit ACh (10^{-4} M/l) während MLA-bedingter Rezeptorblockade induzierte eine transiente Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bei signifikant reduzierter Signalamplitude, verglichen mit den singulären prä- und poststimulatorischen Kontrollapplikationen von ACh (10^{-4} M/l) *per se*.

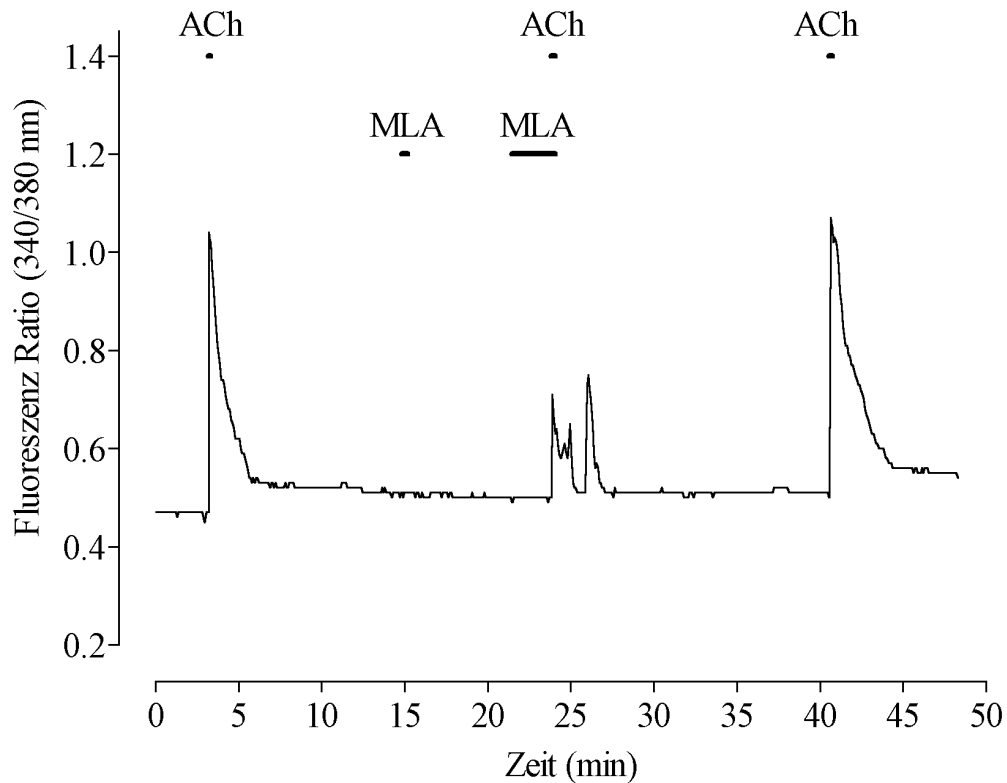


Abbildung 56 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin und MLA

Der selektive $\alpha 7$ nAChR-Antagonist MLA hat den Calciumeinstrom nach Stimulation mit Acetylcholin deutlich gehemmt. Nach Auswaschen des Antagonisten wurden wieder Ratioänderungen erreicht wie vor der Blockade. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 12$ Zellen.

3.3.2.6.2 Heteromere $\alpha 3\beta 4$ nAChR und ω -Conotoxin MVIIC

Das von marinen Kegelschnecken gebildete ω -Conotoxin MVIIC blockiert selektiv $\alpha 3\beta 4$ nAChR, einen nAChR-Subtyp, dessen Existenz neben der homomeren $\alpha 7$ Rezeptoren in vegetativen Ganglien beschrieben wurde (Sharples and Wonnacott 2001, Skok 2002).

Auf den ersten ACh-Stimulus (10^{-4} M/l) reagierten auch in dieser Versuchsreihe 100 % der untersuchten MOL2.3-positiven Zellen ($n = 12$) (Abbildung 57A, a). Die Ratio änderte sich im Mittel um $0,60 \pm 0,11$ (Abbildung 57B, a). Das ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l; Konzentration in der Messkammer) alleine, als Bolus in die Messkammer pipettiert, führte bei keiner einzigen Zelle *per se* zu einer Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration (Abbildung 57A & B, b). Bei ACh-Zugabe (10^{-4} M/l) nach zweiminütiger Vorinkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l; Konzentration in der Messkammer) reagierten 16,7 % der Zellen überhaupt nicht mehr. Die Ratioerhöhung der Zellen betrug nur noch $0,33 \pm 0,08$ ($n = 12$; $0,40 \pm 0,08$ bei den reagierenden Zellen, $n = 10$) (Abbildung 57A & B, c), was allerdings dem ersten ACh-Stimulus gegenüber statistisch nicht signifikant war ($2P > 0,05$). Auf die finale Applikation von ACh (10^{-4} M/l) hin erhöhte sich die Ratio aller Zellen um $0,33 \pm 0,05$ (Abbildung 57A & B, d). Auch diese Erhöhung ist im Vergleich zu den bisherigen Stimulationen mit ACh (mit und ohne ω -Conotoxin MVIIC) nicht signifikant unterschiedlich ($2P > 0,05$). Die Blockade von $\alpha 3\beta 4$ nAChR hat demzufolge nur bei wenigen Zellen einen Einfluss auf das Antwortverhalten der Zellen gegenüber cholinерger Stimulation.

Ein geringer Teil der MOL2.3-positiven Zellen scheint also $\alpha 3\beta 4$ nAChR zu exprimieren, da nach deren Blockade nicht mehr alle untersuchten Zellen auf den ACh-Stimulus hin mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio reagierten.

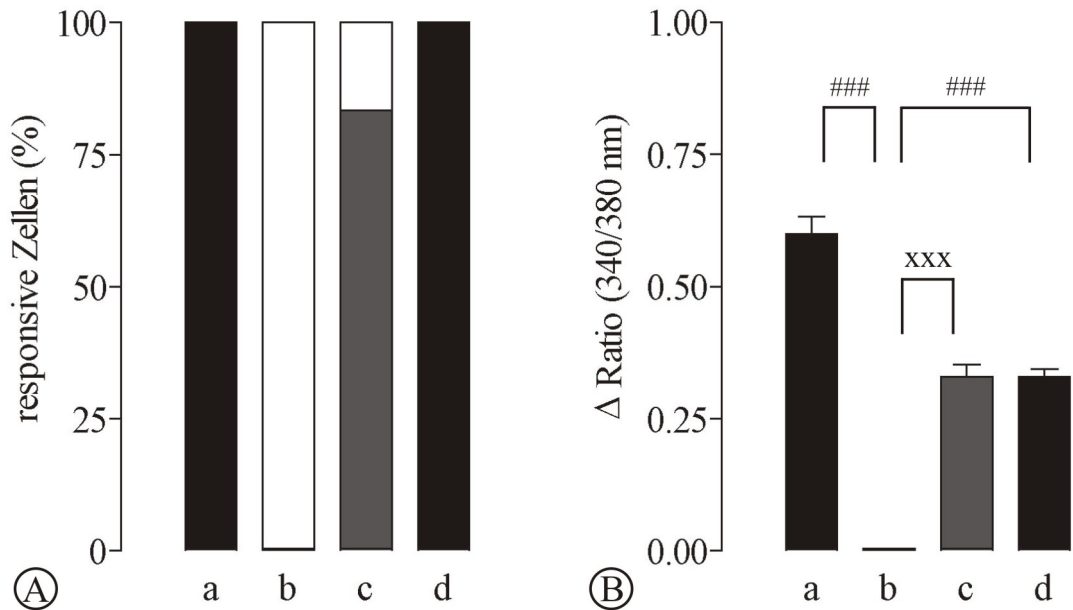


Abbildung 57 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIC

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 12$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 12$).

/ xxx kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Auch bei der Untersuchung MOL2.3-negativer Zellen im Hinblick auf die funktionelle Expression spezifischer $\alpha 3\beta 4$ nAChR wurden am Anfang und Ende eines jeden Versuchs alle Zellen mit ACh (10^{-4} M/l) stimuliert. Wie schon bei den MOL2.3-positiven Zellen beobachtet, reagierten auch 100 % der MOL2.3-negativen Zellen auf diese externen Stimulationen (Abbildung 58A, a & c) ($n = 10$). Die mittlere Ratioerhöhung betrug bei der ersten ACh-Applikation $0,69 \pm 0,10$ (Abbildung 58B, a), bei der zweiten $0,42 \pm 0,06$ (Abb. 3.X.B, d). Das ω -Conotoxin MVIIC alleine hatte keinen Einfluss auf die Fluoreszenz Ratio der Zellen (Abbildung 58A & B, b). Nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l) konnte ACh bei 10 % der untersuchten Zellen keine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ mehr auslösen (Abbildung 58A, c). Diese resultierte in einem Ratioanstieg der Zellen von $0,31 \pm 0,05$ ($n = 10$; $0,34 \pm 0,03$ bei den reagierenden Zellen, $n = 9$), welcher signifikant niedriger war als

bei der ersten ACh-Applikation ($2P \leq 0,01$) (Abbildung 58B, c). Bei den MOL2.3-negativen Zellen hat die Blockade der $\alpha 3\beta 4$ nAChR also einen deutlicheren Einfluss auf die Signaltransduktion als bei den MOL2.3-positiven Zellen.

Auch mit ω -Conotoxin MVIIC waren keine unterschiedlichen Ratioänderungen zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen zu erzielen ($2P > 0,05$).

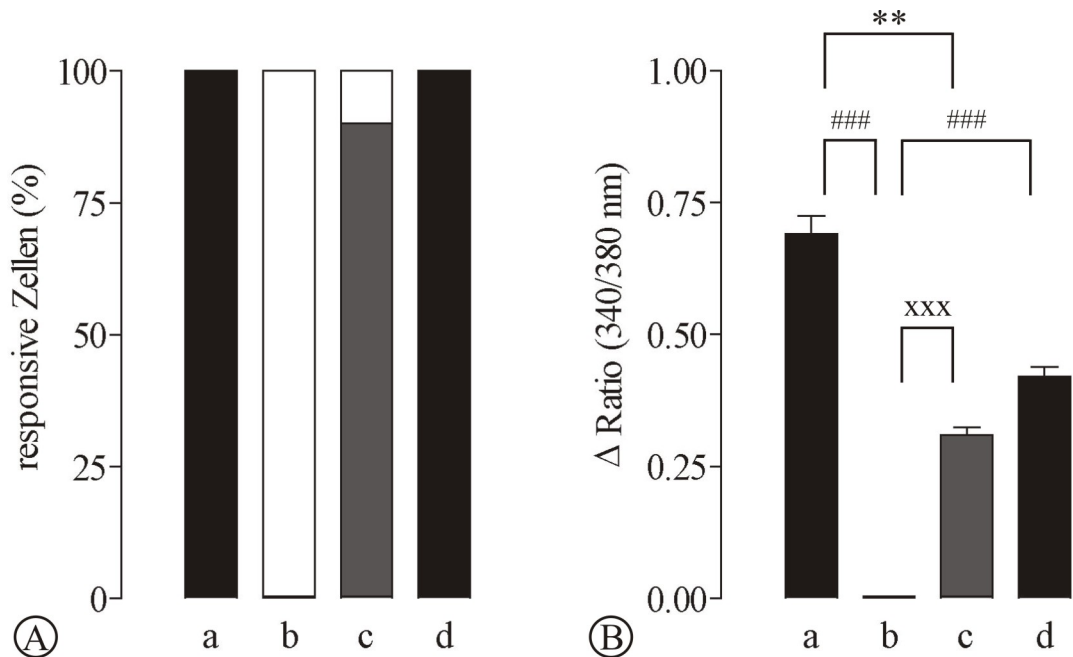


Abbildung 58 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIC

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 10$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), ω -Conotoxin MVIIC (10^{-6} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 10$).

* / # / x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (** ($2P \leq 0,01$), ### / xxx ($2P \leq 0,001$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Da nach Blockade der $\alpha 3\beta 4$ nAChR durch ω -Conotoxin MVIIC nicht alle Zellen auf Co-Applikation von ACh reagierten, ist davon auszugehen, dass ein geringer Prozentsatz (20 %) der MOL2.3-positiven aber auch -negativen Zellen des SPG $\alpha 3\beta 4$ nAChR exprimierte.

Nach diesen Versuchen kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die $\alpha 3\beta 4$ und die homomeren $\alpha 7$ nAChR in denselben Zellen co-exprimiert werden oder aber in verschiedenen Zellen des SPG lokalisiert sind.

Abbildung 59 zeigt, dass die in dem entsprechenden Versuch untersuchte Zelle nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC mit einer niedrigeren Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio auf ACh-Stimulation reagierte als ohne vorherige Blockade der $\alpha 3\beta 4$ nAChR.

Das Bild bei den MOL2.3-negativen Zellen entsprach grundsätzlich dem bei den –positiven.

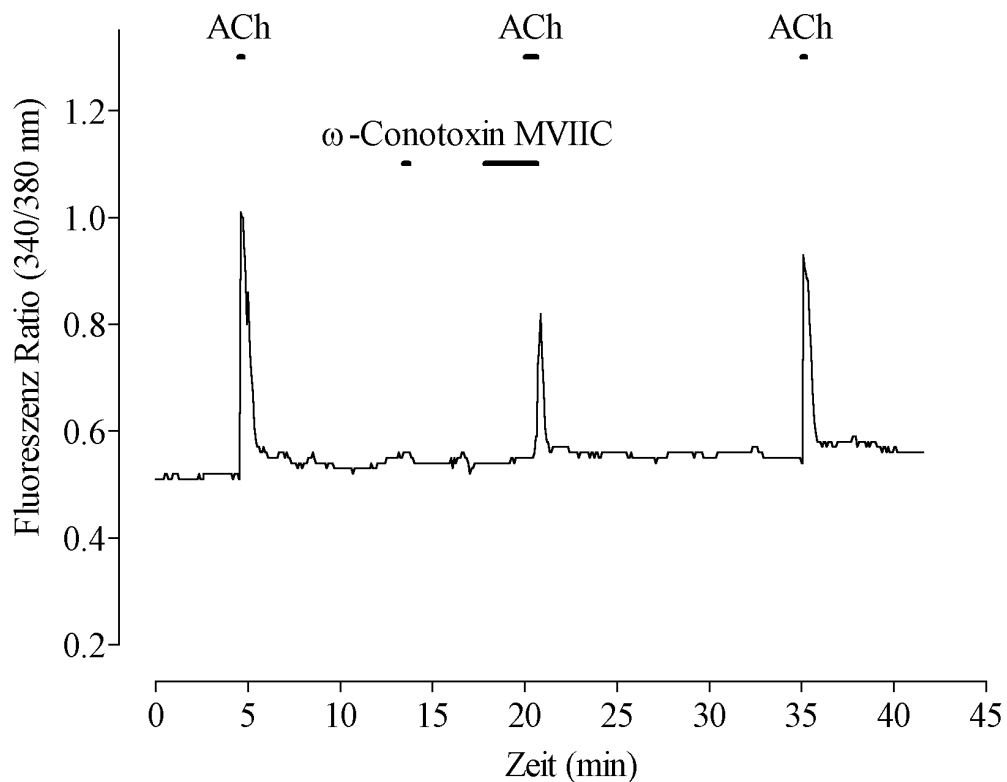


Abbildung 59 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIC

Der selektive $\alpha 3\beta 4$ nAChR-Antagonist ω -Conotoxin MVIIC konnte den Calciumeinstrom nach Stimulation mit Acetylcholin nicht vermindern. Nach Auswaschen des Antagonisten wurden wieder Ratioänderungen erreicht wie vor der Blockade. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 12$ Zellen.

3.3.3 Spannungsabhängige Calcium-Kanäle und ω -Conotoxine bzw. Nifedipin

Mit Hilfe der selektiven Calcium-Kanal Blocker ω -Conotoxin MVIIC bzw. ω -Conotoxin SVIB und Nifedipin sollte untersucht werden, ob die Erhöhung der

intrazellulären Calciumkonzentration nach cholinergem Stimulation –neben der erhöhten Offenwahrscheinlichkeit $\alpha 7$ - bzw. $\alpha 3\beta 4$ -spezifischer nAChR- durch eine zusätzliche Öffnung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle des N- oder L-Typs bedingt sein könnte.

3.3.3.1 N-Typ Calcium-Kanäle und ω -Conotoxine

Bei den ω -Conotoxinen handelt es sich um hochaktive kurzkettige Peptide, synthetisiert von Vertretern mariner Kegelschnecken. Das ω -Conotoxin MVIIA repräsentiert einen reversiblen Antagonisten von N-Typ Ca^{2+} -Kanälen; ω -Conotoxin SVIB dagegen blockiert irreversibel spannungsabhängige N-Typ Ca^{2+} -Kanäle.

Nach Primärstimulation kultivierter SPG-Neurone mit ACh (10^{-4} M/l) wurde die Superfusionspumpe angehalten und die Zellen für 5 Minuten mit ω -Conotoxin MVIIA-haltigem Puffer (10^{-5} M/l) inkubiert. Darauf folgte eine wiederholte Applikation von ACh. Nach diesem Stimulus wurde wiederum einige Minuten abgewartet, bis ein finaler ACh-Stimulus erfolgte. Wie aus Abbildung 60A deutlich zu ersehen ist, reagierten die untersuchten MOL2.3-positiven Zellen jeweils zu 100 % mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio auf die verschiedenen Stimulationen (Abbildung 60A, a-c). Auch bei der Höhe der Ratioanstiege konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Stimulationen festgestellt werden ($2P > 0,05$). Die Ratio stieg bei der ersten ACh-Applikation um $0,77 \pm 0,09$ (Abbildung 60B, a). ACh nach Inkubation mit dem Ca^{2+} -Kanal Blocker löste eine Ratioerhöhung von $0,90 \pm 0,11$ aus, und die letzte Zugabe von ACh bewirkte einen Anstieg der Ratio um $0,85 \pm 0,10$ (Abbildung 60B, b & c).

Mit dem irreversiblen Blocker ω -Conotoxin SVIB (10^{-5} M/l) konnten die Resultate der oben beschriebenen Versuchsreihe bestätigt werden. Auch eine Inkubation mit diesem N-Typ Ca^{2+} -Kanal Blocker zeigte keinen Einfluss auf die Größe des Calcium-Einstroms nach Stimulation mit ACh (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ nach cholinergem Stimulation MOL2.3-positiver Zellen nicht durch eine sekundäre Öffnung spannungsgesteuerter N-Typ Calcium-Kanäle zustande kam.

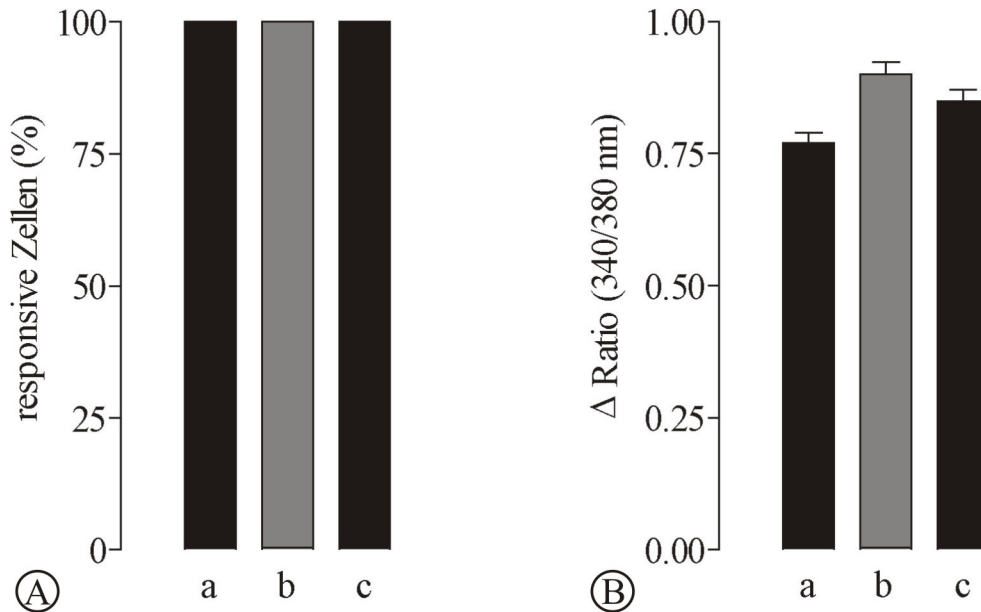


Abbildung 60 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIA (10^{-5} M/l) (b) und einem ACh-Kontrollstimulus (c) (n = 21).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (10^{-5} M/l) (b) und ACh (c) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 21).

Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Die Ratioänderungen der MOL2.3-negativen Zellen dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls gemessen und ausgewertet. Alle Zellen reagierten auf die initiale ACh-Applikation (10^{-4} M/l) mit einem Ratio-Peak von $0,54 \pm 0,18$ (Abbildung 61A & B, a) (n = 13). Präinkubation mit ω -Conotoxin MVIIA (10^{-5} M/l) bewirkte, dass eine Zelle vollständig gehemmt wurde, und nur 92,3 % der Zellen einen Anstieg der Ratio um $0,47 \pm 0,12$ (n = 13; $0,50 \pm 0,12$ bei den reagierenden Zellen, n = 12) zeigten (Abbildung 61A & B, b). Auf den dritten ACh-Stimulus, ohne unmittelbar vorangegangene Inkubation mit dem Toxin, antworteten wiederum 100 % der Zellen mit einer Ratioerhöhung von $0,58 \pm 0,14$ (Abbildung 61A & B, c). Auch bei den MOL2.3-negativen Zellen waren die Änderungen der Ratio bei den unterschiedlichen Stimulationen nicht signifikant unterschiedlich (2P > 0,05).

Das ω -Conotoxin SVIB (10^{-5} M/l) blockierte ebenfalls nur bei einem extrem geringen Anteil der untersuchten Zellen die intrazelluläre Calcium-Konzentrationserhöhung nach cholinerg Stimulation (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich nach diesen Versuchen sagen, dass Calcium nach cholinergem Stimulation MOL2.3-negativer Zellen nur bei einem sehr kleinen Teil der untersuchten Zellen durch N-Typ Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle strömte.

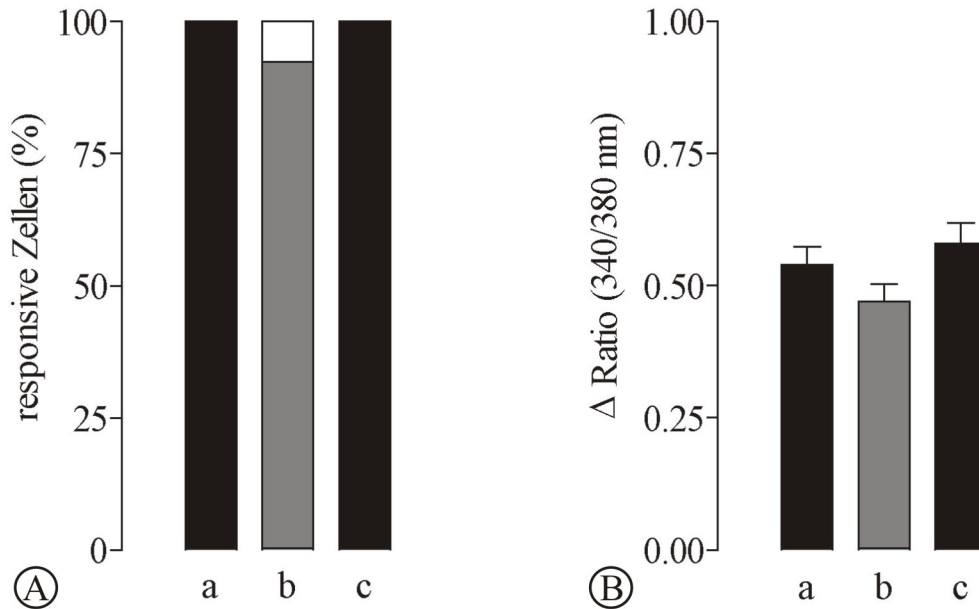


Abbildung 61 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIA (10^{-5} M/l) (b) und einem ACh-Kontrollstimulus (c) (n = 13).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIC (10^{-5} M/l) (b) und ACh (c) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 13).

Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

ACh wurde in diesen Versuchen über die Perfusionspumpe in die Messkammer superfundiert. Die Abbildung 62 zeigt die Ratio-Peaks nach der cholinergen Stimulation MOL2.3-positiver Zellen. Es ist klar zu sehen, dass die Applikation des ω -Conotoxin MVIIA selbst keine Auswirkung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit die Fluoreszenz Ratio hatte, und darüber hinaus die cholinerge Induktion des zellulären Ca^{2+} -Signals nicht zu modifizieren vermochte.

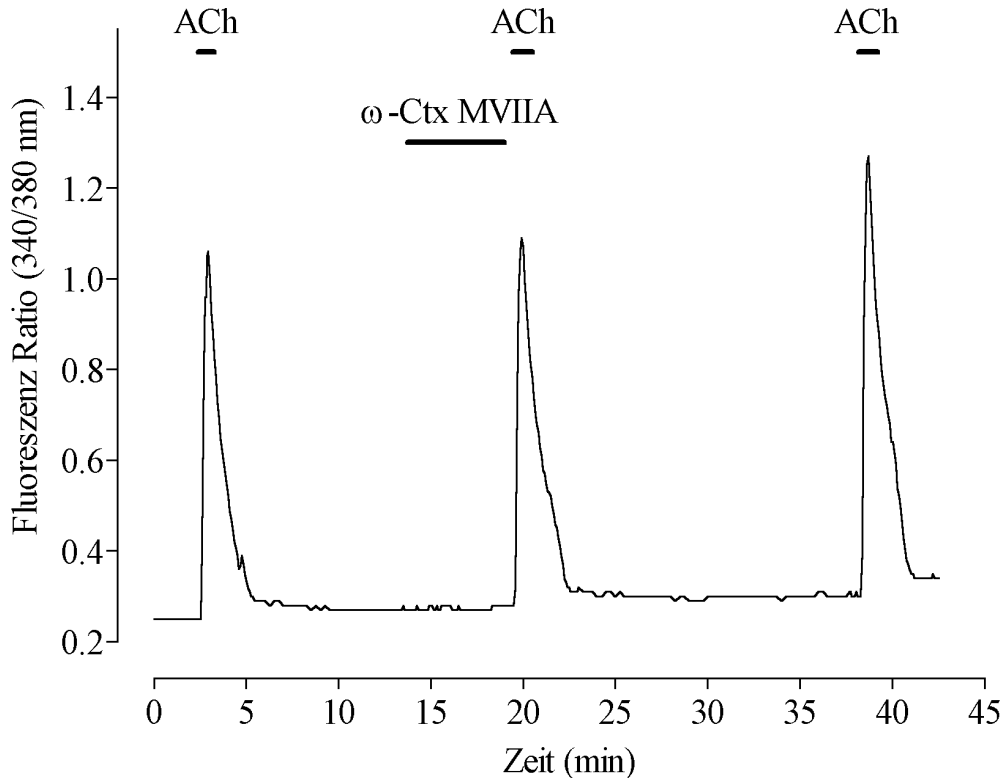


Abbildung 62 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin, ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIA und einem ACh-Kontrollstimulus

Blockade der N-Typ Calciumkanäle bewirkt keine Verminderung der Ratioänderung nach cholinergem Stimulus. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 13$ Zellen.

3.3.3.2 L-Typ Calcium-Kanäle und Nifedipin

Nifedipin blockiert kurzfristig und selektiv die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsgesteuerter L-Typ Calcium-Kanäle. Da in den oben beschriebenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass der verbleibende, nAChR-unabhängige Ca^{2+} -Einstrom nach cholinergem Stimulus nicht durch N-Typ Ca^{2+} -Kanäle erfolgt, sollte nun untersucht werden, ob L-Typ Kanäle für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sind.

Alle MOL2.3-positiven Zellen dieser Versuchsreihe zeigten auf die erste Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) eine Erhöhung der Ratio von $0,48 \pm 0,09$ (Abbildung 63A & B, a) ($n = 13$). Nifedipin (10^{-4} M/l) löste bei 15,4 % der Zellen einen Ratioanstieg von $0,09 \pm 0,06$ ($n = 13$; $0,58 \pm 0,03$ bei den reagierenden Zellen, $n = 2$) aus (Abbildung 63A & B, b). Nachdem die Zellen mit Nifedipin präinkubiert worden waren, konnte ACh bei 30,8 % der Zellen keine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ mehr bewirken. Diese spiegelte sich in einer durchschnittlichen Ratioänderung von $0,17 \pm 0,04$ ($n = 13$; $0,24 \pm 0,04$ bei den reagierenden Zellen, $n = 9$) wieder, was einen

signifikanten Unterschied im Vergleich zu der ersten ACh-Stimulation bedeutet ($2P \leq 0,01$) (Abbildung 63A & B, c). Der finale ACh-Stimulus, ohne vorherige Blockade der Ca^{2+} -Kanäle, führte bei allen untersuchten Zellen zu einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio um $0,24 \pm 0,04$ (Abbildung 63A & B, d). Auch dieser Wert ist statistisch gesehen signifikant niedriger als der beim ersten ACh-Stimulus.

Den gerade dargestellten Ergebnissen zufolge bewirkte eine Stimulation mit Acetylcholin bei etwa 30 % der MOL2.3-positiven Zellen den Einstrom von Ca^{2+} ausschließlich durch spannungsgesteuerte L-Typ Calcium-Kanäle. Bei den anderen Zellen gelangte möglicherweise zumindest ein Teil des Calciums über L-Typ Kanäle ins Zellinnere. Ermittelt man nämlich den arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. der Ratioänderung der 9 Zellen, welche nach Nifedipin-Applikation noch responsiv waren, so sieht man, dass dieser mit $0,24 \pm 0,04$ deutlich von der Ratioänderung bei ACh-Stimulation ohne Calcium-Kanal Blockade abweicht. Neben den L-Typ Calcium-Kanälen muss es hier also noch einen anderen Weg für die Calciumionen ins Zytoplasma geben, so z.B. die oben beschriebenen $\alpha 7$ und $\alpha 3\beta 4$ nAChR.

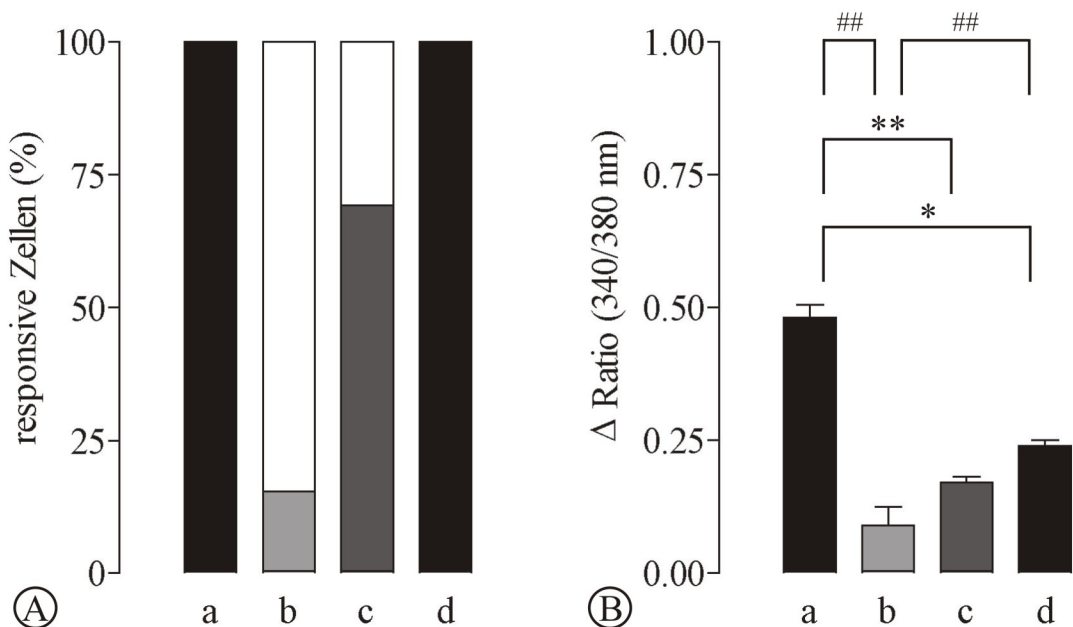


Abbildung 63 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und Nifedipin

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), Nifedipin (10^{-4} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Nifedipin (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 13$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), Nifedipin (10^{-4} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Nifedipin (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 13$).

* / # kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* ($2P \leq 0,05$) und ** / ## ($2P \leq 0,01$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Bei den MOL2.3-negativen Zellen sind die Resultate denen der positiven Zellen vergleichbar: Die untersuchten Zellen reagierten zu 100 % auf die ACh-Stimulationen (10^{-4} M/l) am Anfang und am Ende eines jeden Versuchs (Abbildung 64A, a & d) ($n = 12$). Die Ratioerhöhung nach der ersten ACh-Applikation betrug $0,47 \pm 0,08$ (Abbildung 64B, a). Die alleinige Inkubation der Zellen mit Nifedipin (10^{-4} M/l) löste bei 41,7 % der Zellen einen Ratio-Peak aus; die mittlere Änderung der Fluoreszenz Ratio lag bei $0,10 \pm 0,04$ ($n = 12$; $0,24 \pm 0,05$ bei den reagierenden Zellen, $n = 5$) (Abbildung 64A & B, b). Blockade der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch fünfminütige Inkubation mit Nifedipin bewirkte bei 25 % der Zellen eine vollständige Hemmung des Calciumionen-Einstroms nach cholinergischer Stimulation. Dieser resultierte in einem Ratioanstieg nach Stimulation mit ACh von durchschnittlich $0,19 \pm 0,06$ ($n = 12$; $0,25 \pm 0,07$ bei den reagierenden Zellen, $n = 6$) (Abbildung 64A & B, c). Am Ende des Versuchs reagierten die Zellen mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio von $0,22 \pm 0,05$ auf die ACh-Applikation.

Auch hier waren die Ratioanstiege nach Blockade der L-Typ Calcium-Kanäle signifikant niedriger als vor der Inkubation mit dem Toxin. Es scheint also wie bei den MOL2.3-positiven Zellen so zu sein, dass ein Teil des Calciums nach cholinergischer Stimulation über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle ins Zellinnere gelangt, ein anderer Teil der Ca^{2+} -Ionen über die nicotineren $\alpha 7$ und $\alpha 3\beta 4$ AChR.

Die Ratioänderungen der MOL2.3-positiven Zellen wichen nicht signifikant von denen der –negativen ab ($2P > 0,05$).

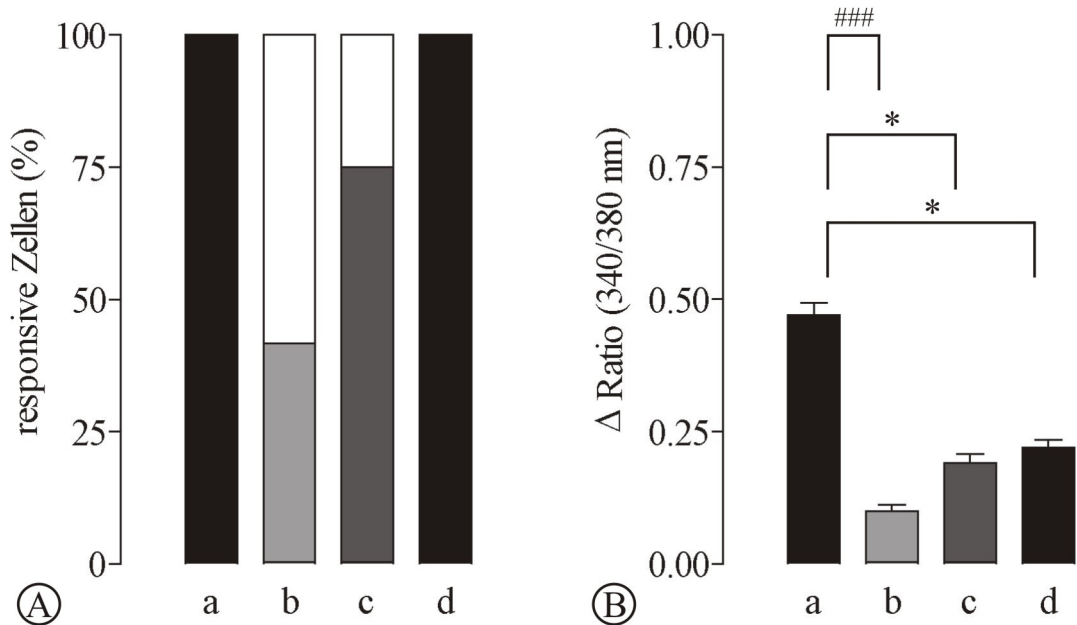


Abbildung 64 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und Nifedipin

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), Nifedipin (10^{-4} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Nifedipin (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) (n = 12).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), Nifedipin (10^{-4} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Nifedipin (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 12).

* / # kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* (2P ≤ 0,05) und ### (2P ≤ 0,001)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Der Graph in der folgenden Abbildung (Abbildung 65) zeigt den zeitlichen Ratio-Verlauf einer MOL2.3-positiven Zelle. Bei dieser Zelle konnte die Calcium-Antwort nach cholinergem Stimulation durch Blockade der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle vermindert, nicht jedoch vollständig unterbunden werden. Sowohl bei den MOL2.3-positiven als auch -negativen Zellen strömen nach cholinergem Stimulation extrazelluläre Calciumionen über $\alpha 7$ und $\alpha 3\beta 4$ nAChR ins Zytoplasma der Zellen, sowie zusätzlich über L-Typ Calcium-Kanäle.

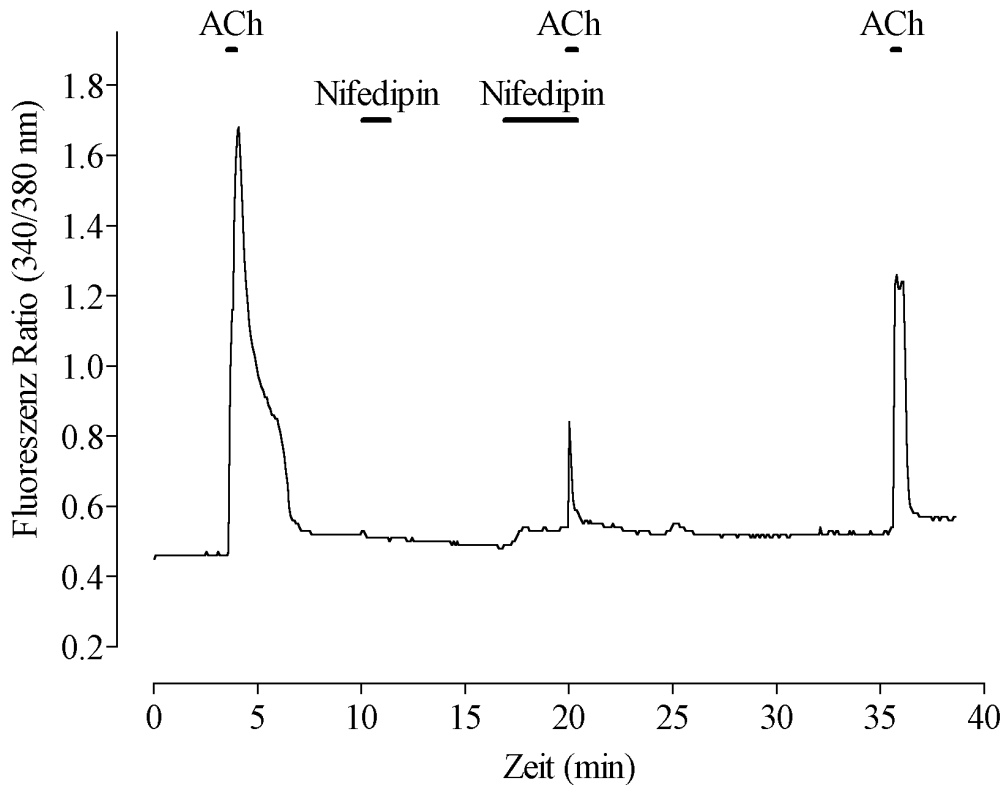


Abbildung 65 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin, Nifedipin, ACh nach Inkubation mit Nifedipin und einem ACh-Kontrollstimulus

Nach Inkubation mit dem L-Typ Calcium-Kanal Blocker Nifedipin war die Ratioerhöhung nach cholinergischer Stimulation signifikant vermindert. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 12$ Zellen.

3.3.4 Stickstoffmonoxid (NO)

Das gasförmige Molekül NO dient im peripheren Nervensystem als atypischer Neurotransmitter. Da in den immunhistochemischen Experimenten dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Zellen des SPG das Stickstoffmonoxid-synthetisierende Enzym nNOS enthalten (Kapitel 91), und außerdem in der Literatur die Lokalisation der nNOS in präganglionären zentralen Kerngebieten des SPG beschrieben wird, sollte mit Hilfe der zellphysiologischer Untersuchungsmethode Calcium-Imaging die Frage nach NO-medierten intrazellulären Calciumsignalen geklärt werden. Hier sollten speziell die Responsivität der Zellen auf nitreger Stimulation, die intrinsische nitreger Aktivität und die Modulation der cholinergen Aktivierung studiert werden. Zu diesem Zweck wurden die synthetischen, hochpotenten NO-Donoren DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazennolat-2-oxid) und

Nor-1 ((±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid), sowie der spezifische nNOS-Blocker Vinyl-L-NIO eingesetzt.

3.3.4.1 Synthetische NO-Donorsubstanzen: DEA

Im Laufe der Versuche konnten 51 MOL2.3-positive und 35 MOL2.3-negative Zellen auf die Wirkung des NO-Donors DEA in einer Endkonzentration von 10^{-3} M/l in der Messkammer untersucht werden. 70,6 % der grün fluoreszierenden Zellen reagierten mit einer Ratioerhöhung von $0,24 \pm 0,06$ (Abbildung 66A & B, a), während sich die Ratio von 80 % der GFP-negativen Zellen um durchschnittlich $0,33 \pm 0,05$ erhöhte (Abbildung 66A & B, b). Statistisch ist der Unterschied des Ratioanstiegs signifikant ($2P \leq 0,001$).

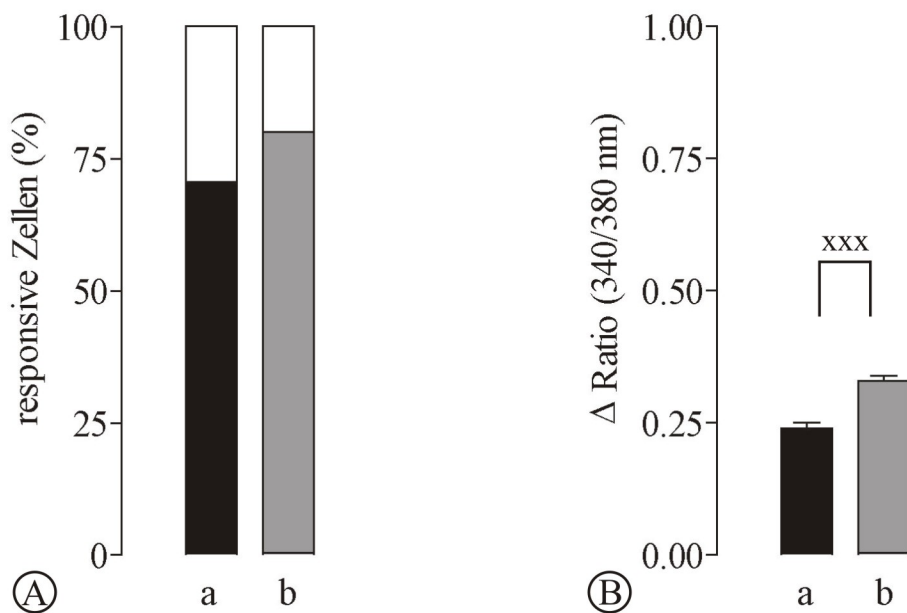


Abbildung 66 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem DEA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver (a) (n = 51) und -negativer (b) (n = 35) Zellen nach Stimulation mit DEA einer Konzentration von 10^{-3} M/l.

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden MOL2.3-positiven (a) (n = 36) bzw. -negativen (b) (n = 28) Zellen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. wider.

xxx kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Die folgende Abbildung (Abbildung 67) zeigt den Verlauf der Fluoreszenz Ratio einer MOL2.3-positiven Zelle nach Stimulation mit DEA bei einer Finalkonzentration des NO-Donors von 10^{-3} M/l in der Messkammer. Es ist klar zu erkennen, dass die Ratio nach DEA-Applikation von einer konstanten Basallinie aus ansteigt.

Um auszuschließen, dass die Ratioerhöhungen der Zellen von dem DEA-„Muttermolekül“ (Strukturformel siehe Abbildung 21) ausgelöst wurden, wurde zu einigen Zellen inaktiviertes, NO-depletiertes DEA gegeben. Um DEA zu inaktivieren, wurde es 24 Stunden lang Licht, Raumtemperatur und Sauerstoff ausgesetzt. Keine der Zellen, zu denen das inaktivierte DEA gegeben wurde, zeigte daraufhin eine Ratioerhöhung.

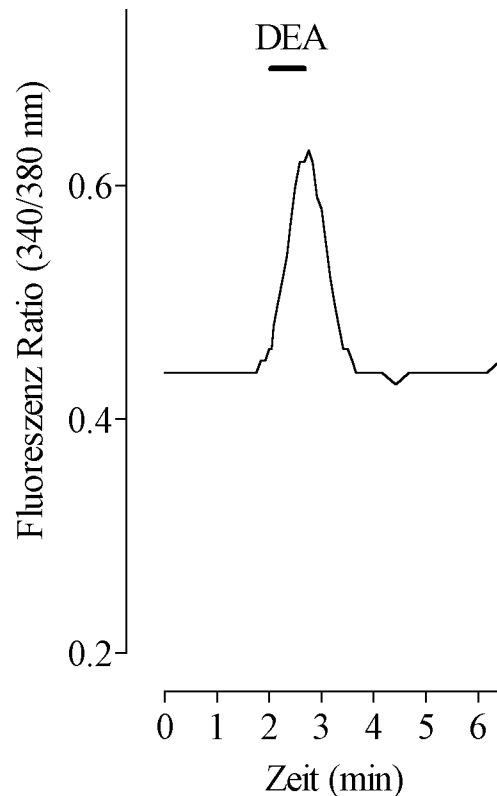


Abbildung 67 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit dem NO-Donor DEA
Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für n = 36 Zellen.

Durch Co-Stimulation der Zellen mit ACh (10^{-4} M/l) und DEA (10^{-3} M/l) sollte untersucht werden, ob Stickstoffmonoxid einen Einfluss auf die zelluläre, cholinerg vermittelte Signaltransduktion hat.

Hierzu wurden die Zellen zunächst mit ACh einer Konzentration von 10^{-4} M/l stimuliert, um ihr Antwortverhalten zu demonstrieren. Hier zeigte sich wie schon in vorangegangenen Versuchen, dass 100 % der Zellen auf diesen Stimulus hin mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierten (Abbildung 68A, a) ($n = 25$). Die Ratioerhöhung betrug $0,64 \pm 0,05$ (Abbildung 68B, a). Auf die folgende Bolusapplikation mit 10^{-3} M/l DEA reagierten 76 % der untersuchten Zellen mit einer Ratioerhöhung von $0,23 \pm 0,02$ ($n = 25$; $0,16 \pm 0,01$ bei den reagierenden Zellen, $n = 19$) (Abbildung 68A & B, b). Um die Zellen mit DEA und ACh zu co-stimulieren, wurden die Substanzen in randomisiert alternierender Sequenz mit einem mittleren zeitlichen Abstand von 2 Sekunden als Boli bei sistierender Superfusion in die Messkammer pipettiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach Co-Stimulation mit beiden Substanzen alle Neurone mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierten (Abbildung 68A, c). Der mittlere Anstieg der Fluoreszenz Ratio mit Werten von $0,46 \pm 0,05$ erwies sich jedoch gegenüber der zuvor durchgeführten Kontrollstimulation mit ACh (10^{-4} M/l) alleine als signifikant erniedrigt ($2P \leq 0,01$) (Abbildung 68B, c). Die poststimulatorische Kontrollapplikation von ACh löste wiederum bei allen untersuchten Zellen eine Erhöhung der Ratio um $0,48 \pm 0,05$ aus (Abbildung 68A & B, d). Auch dieser Wert liegt noch signifikant unter dem, welcher bei der ersten Zugabe von ACh gemessen wurde ($2P \leq 0,05$), jedoch weicht er statistisch nicht signifikant vom durchschnittlichen Ratioanstieg bei Co-Stimulation mit ACh und DEA ab ($2P > 0,05$).

NO als Neuromodulator scheint demzufolge bei den MOL2.3-positiven Zellen einen hemmenden Einfluss auf die Signaltransduktion nach cholinergem Stimulus zu haben.

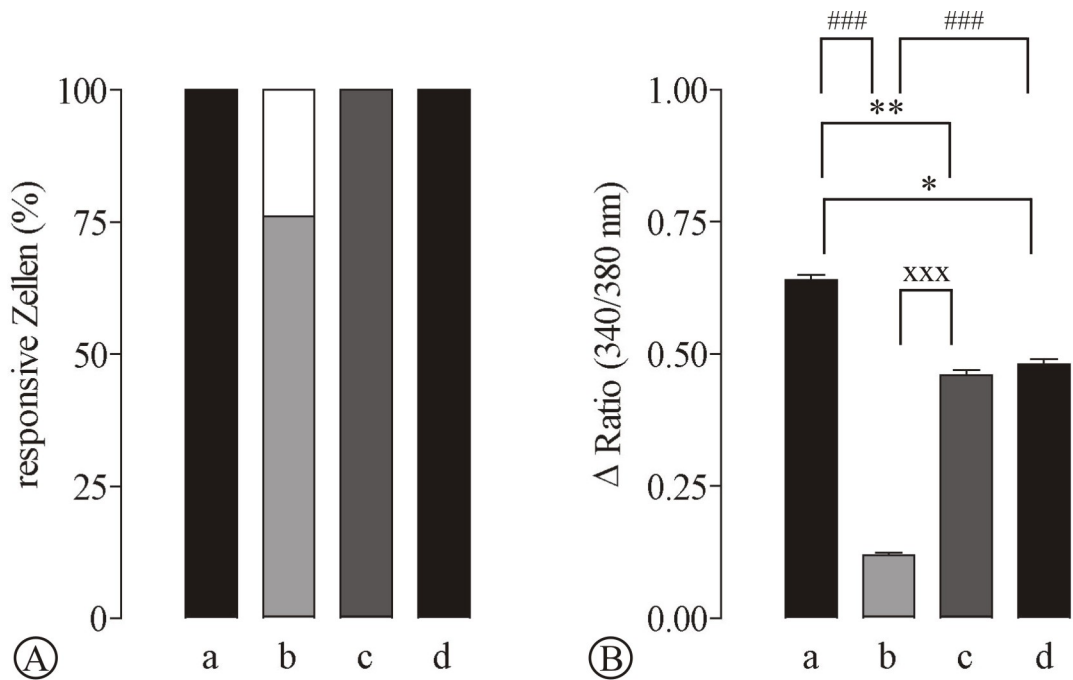


Abbildung 68 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und DEA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), DEA (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit DEA (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) (n = 25).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), DEA (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit DEA (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 25).

* / # / x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* ($2P \leq 0,05$), ** ($2P \leq 0,01$) und *** / xxx ($2P \leq 0,001$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Bei den entsprechenden Untersuchungen an MOL2.3-negativen Zellen ergaben sich folgende Zahlen: Von den 25 Zellen, deren Daten in der Auswertung berücksichtigt wurden, reagierten 80 % auf den ersten ACh-Stimulus (10^{-4} M/l) (Abbildung 69A, a). Die mittlere Ratioänderung betrug $0,59 \pm 0,09$ (Abbildung 69B, a). Auf Stimulation mit DEA (10^{-3} M/l) hin kam es bei 84 % der Zellen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$, welcher in einer mittleren Ratioänderung von $0,28 \pm 0,06$ (n = 25; $0,33 \pm 0,06$ bei den reagierenden Zellen, n = 21) resultierte (Abbildung 69A & B, b). Co-Applikation von DEA und ACh konnte ebenfalls bei 84 % der Zellen einen Ratioanstieg bewirken, welcher bei $0,48 \pm 0,07$ (n = 25; $0,57 \pm 0,07$ bei den reagierenden Zellen, n = 21) lag (Abbildung 69A & B, c). Auf den jeweils letzten Stimulus einer jeden Versuchsreihe, ACh 10^{-4} M/l, reagierten 88 % der Zellen mit einer durchschnittlichen Ratioänderung von $0,47 \pm 0,07$ (Abbildung 69A & B, d).

Die Zahlen in Abbildung 69A kamen folgendermaßen zustande: Die meisten Zellen (18) antworteten auf alle 4 Stimulationen. 2 Zellen reagierten auf alle Stimuli, mit Ausnahme von DEA. Jeweils 2 der insgesamt 25 Zellen reagierten entweder ausschließlich auf DEA oder den zweiten ACh-Stimulus. Lediglich bei einer Zelle war zu beobachten, dass sie auf Stimulationen mit DEA reagierte (DEA und DEA in Kombination mit ACh), nicht aber auf einzeln appliziertes ACh.

Bei diesen Versuchsreihen scheint sich also ein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und MOL2.3-negativen Zellen abzuzeichnen. Bei den MOL2.3-positiven Zellen war nach Stimulation mit DEA in Kombination mit ACh sowie bei der darauf folgenden zweiten ACh-Applikation der Anstieg der Ratio im Vergleich zur ersten Stimulation mit ACh signifikant erniedrigt (Abbildung 69B, a, c & d). Bei den MOL2.3-negativen Zellen dagegen erwiesen sich die Unterschiede der Änderungen der Fluoreszenz Ratio bei den drei entsprechenden Stimulationen (1. ACh, ACh + DEA, 2. ACh) statistisch als nicht signifikant (Abbildung 69B, a, c & d).

Die durch Bolusapplikation des NO-Donors DEA induzierte Erhöhung der freien $[Ca^{2+}]_{iz}$ erwies sich bei den MOL2.3-positiven Zellen gegenüber den MOL2.3-negativen Neuronen als signifikant erniedrigt ($2P \leq 0,01$).

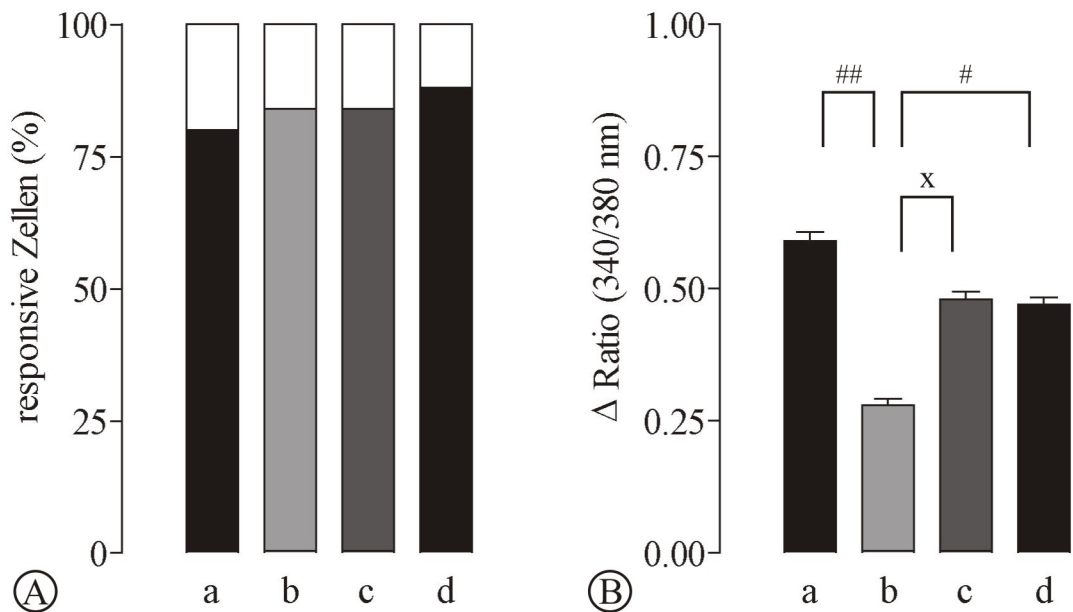


Abbildung 69 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und DEA

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), DEA (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit DEA (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) (n = 25).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), DEA (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit DEA (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) (n = 25).

³ M/l) (b), ACh co-appliziert mit DEA (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 25$).

/ x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (# / x ($2P \leq 0,05$) und ## ($2P \leq 0,01$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Im Folgenden soll beispielhaft die Ratio-Kurve einer MOL2.3-positiven Zelle gezeigt werden (Abbildung 70). Bei dieser Zelle konnte DEA nur eine geringe Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auslösen. Der Ratioanstieg nach Co-Applikation von DEA und ACh war deutlich geringer als nach Stimulation mit ACh alleine.

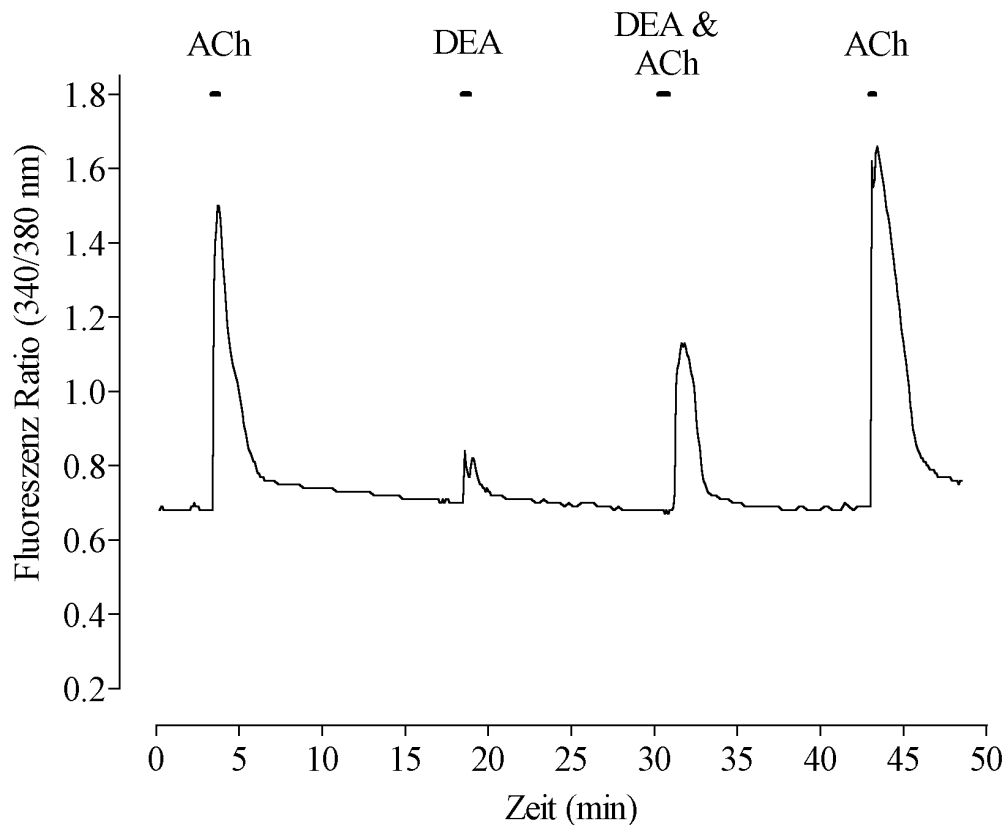


Abbildung 70 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des Ganglion sphenopalatinum nach Stimulation mit Acetylcholin, DEA, ACh co-appliziert mit DEA und einem ACh-Kontrollstimulus

Durch den NO-Donor wurde der Calcium-Einstrom nach cholinergem Stimulation gehemmt. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 25$ Zellen.

3.3.4.2 Synthetische NO-Donorsubstanzen: Nor-1

Nor-1 ((±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid) ist neben DEA ein weiterer potenter NO-Donor. Hier werden lediglich vorläufige Daten von jeweils $n = 6$ MOL2.3-positiven und -negativen Zellen angegeben.

Auch in dieser Versuchsreihe wurden die MOL2.3-positiven mit den -negativen Neuronen des SPG hinsichtlich ihrer nitrergen Stimulierbarkeit verglichen. Von den jeweils 6 untersuchten Zellen reagierten 66,7 % der MOL2.3-positiven und 33,3 % der -negativen auf Stimulation mit Nor-1 in einer Endkonzentration von 10^{-3} M/l in der Messkammer (Abbildung 71A). Die reagierenden MOL2.3-positiven Zellen zeigten eine durchschnittliche Ratioänderung von $0,16 \pm 0,04$ (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.), die MOL2.3-negativen Zellen von $0,17 \pm 0,09$ (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes) (Abbildung 71B).

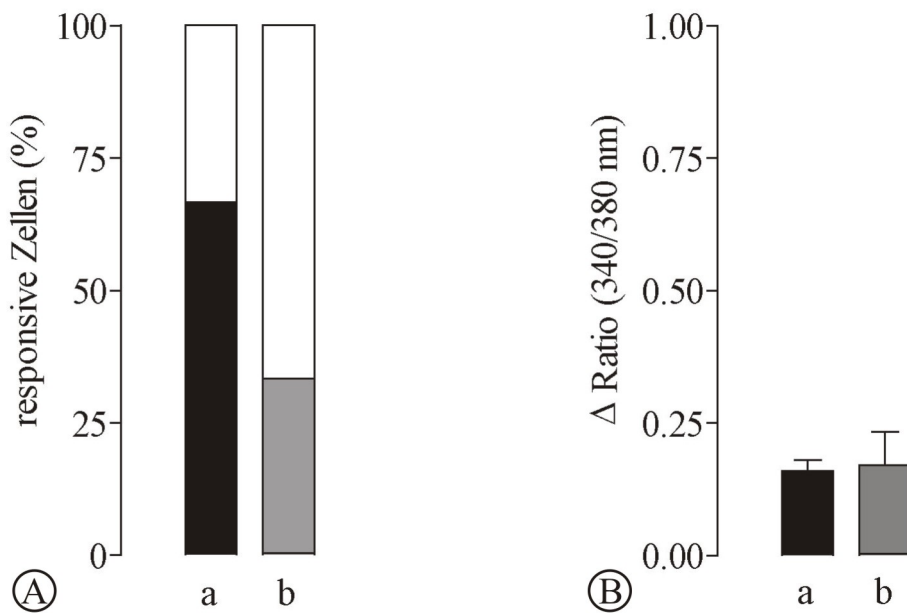


Abbildung 71 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem Nor-1

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver (a) ($n = 6$) und -negativer (b) ($n = 6$) Zellen nach Stimulation mit Nor-1 einer Konzentration von 10^{-3} M/l.

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden MOL2.3-positiven (a) ($n = 4$) (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) bzw. -negativen (b) ($n = 2$) Zellen (arithmetischer Mittelwert \pm SA.) wider.

Der Ratioverlauf, welcher in Abbildung 72 dargestellt ist, zeigt das charakteristische Antwortverhalten einer MOL2.3-positiven Zelle nach Bolusapplikation von Nor-1 einer Konzentration von 10^{-3} M/l. Bei nahezu allen

untersuchten Zellen, egal ob MOL2.3-positiv oder -negativ, blieb die Ratio-Basallinie nach dem Nor-1-Stimulus auf einem etwas höheren Niveau (etwa 0,05-0,1) als vor dem Stimulus.

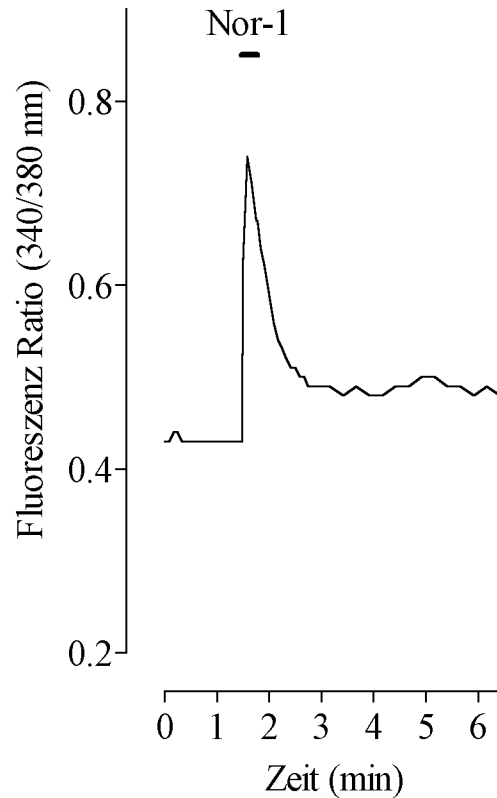


Abbildung 72 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Nor-1
Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für n = 4 Zellen.

Mit Nor-1 wurden, ebenso wie mit DEA, Co-Stimulationsexperimente mit Acetylcholin durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen reagierten 100 % der untersuchten MOL2.3-positiven Zellen auf Bolusapplikation von ACh (10^{-4} M/l) mit einer Ratioerhöhung von durchschnittlich $1,10 \pm 0,24$ (Abbildung 73A & B, a) (n = 6). 66,7 % der Zellen zeigten nach Stimulation mit Nor-1 (10^{-3} M/l) eine Erhöhung der Ratio um $0,10 \pm 0,04$ (n = 6; $0,16 \pm 0,03$ bei den reagierenden Zellen, n = 4) (Abbildung 73A & B, b). Auf die gleichzeitige Applikation von Nor-1 und ACh hin war wiederum bei allen Zellen ein Ratioanstieg zu beobachten (Abbildung 73A, c & d). Das Maximum der Ratioerhöhung betrug bei Co-Stimulation von ACh und Nor-1 im Schnitt $0,45 \pm 0,11$, bei der abschließenden ACh-Applikation $0,82 \pm 0,21$ (Abbildung 73B, c & d). Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney U Ranking Test zeigte, dass sich die erste ACh-Stimulation, die Co-Stimulation mit

ACh und Nor-1 sowie die zweite ACh-Stimulation nicht signifikant voneinander unterschieden ($2P > 0,05$). Demzufolge hat NO keinen Einfluss auf die cholinerge Signaltransduktion.

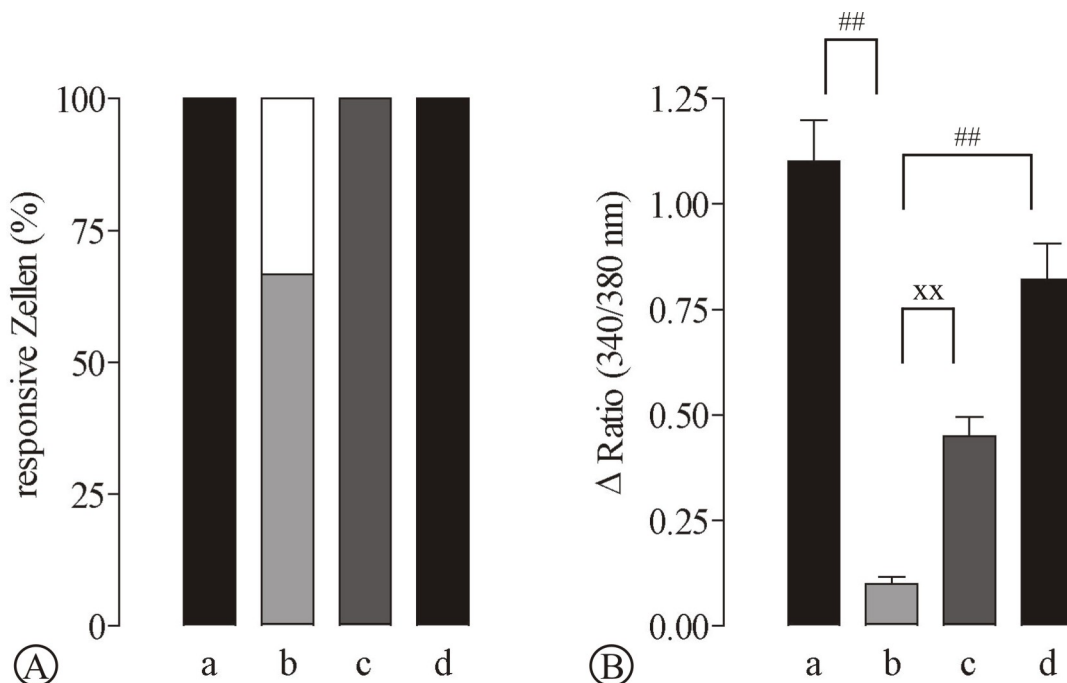


Abbildung 73 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und Nor-1

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), Nor-1 (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit Nor-1 (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 6$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), Nor-1 (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit Nor-1 (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 6$).

/ xx kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (## / xx ($2P \leq 0,01$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Es wurden außerdem 6 MOL2.3-negative Zellen im Hinblick auf ihr Antwortverhalten nach Stimulation mit Nor-1 und Acetylcholin untersucht. Alle Zellen zeigten eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ nach der ersten und der letzten Bolusapplikation von ACh (10^{-4} M/l), sowie nach Co-Applikation von Acetylcholin und Nor-1 (Abbildung 74A, a,b & c). Die Applikation von Nor-1 einer Konzentration von 10^{-3} M/l bewirkte bei lediglich 33,3 % der Zellen einen Anstieg der Fluoreszenz Ratio (Abbildung 74A, b). Die Ratioänderung betrug nach der ersten Applikation von ACh $0,79 \pm 0,23$ ($n = 6$; $0,17 \pm 0,09$ (MW \pm SA) bei den

reagierenden Zellen, $n = 2$), während Nor-1 eine durchschnittliche Erhöhung der Ratio von lediglich $0,06 \pm 0,04$ auslöste (Abbildung 74B, a, b). Nor-1 und ACh erhöhten die Ratio der Zellen bei Co-Applikation im Mittel um lediglich $0,29 \pm 0,06$ (Abbildung 74B, c). Nach dem finalen ACh-Bolus war bei den Zellen ein Ratio-Anstieg von $0,34 \pm 0,13$ zu messen (Abbildung 74B, d). Wie es schon bei den MOL2.3-positiven Zellen der Fall war, weichen auch bei den MOL2.3-negativen Zellen die Ratioänderungen der Stimulationen mit Acetylcholin sowie mit Acetylcholin und Nor-1 nicht signifikant voneinander ab ($2P > 0,05$).

Auch hier ist kein Unterschied in der Höhe der Ratioänderung zwischen den MOL2.3-positiven und -negativen Zellen nachzuweisen ($2P > 0,05$).

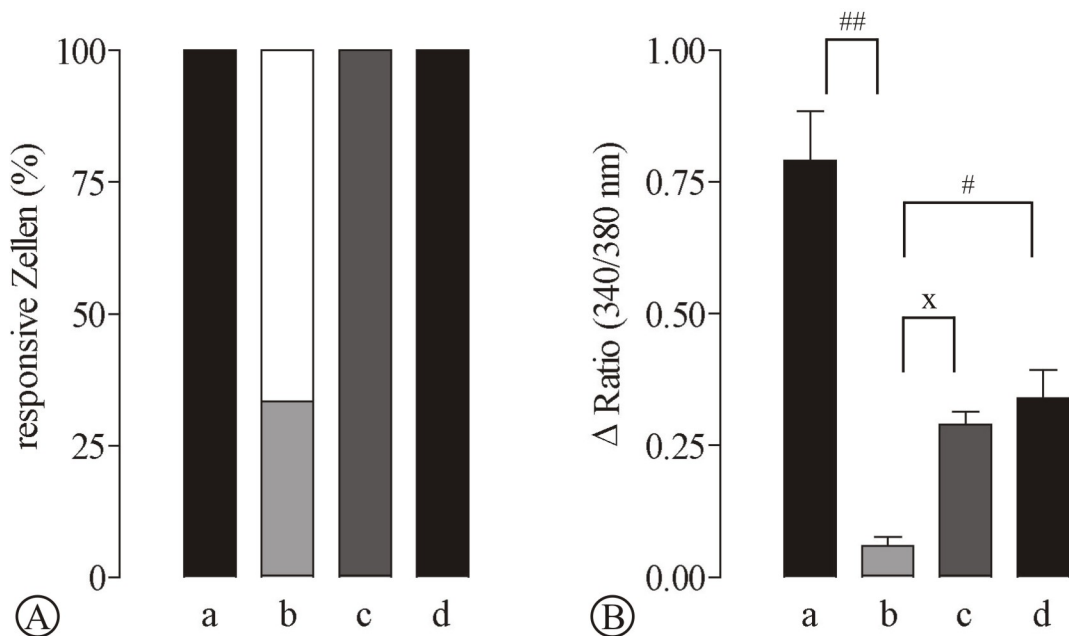


Abbildung 74 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und Nor-1

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), Nor-1 (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit Nor-1 (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 6$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), Nor-1 (10^{-3} M/l) (b), ACh co-appliziert mit Nor-1 (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 6$).

/ x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (# / x ($2P \leq 0,05$) und ## ($2P \leq 0,01$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Die folgende Abbildung mit dem Ratioverlauf eines der eben beschriebenen Versuche an einer MOL2.3-positiven Zelle zeigt, dass der Ratioanstieg nach Co-

Stimulation mit Nor-1 und ACh deutlich niedriger ist als nach alleiniger cholinergischer Stimulation. Die abschließende Applikation von ACh resultiert in einer geringeren Erhöhung der Fluoreszenz Ratio als die erste cholinerge Stimulation.

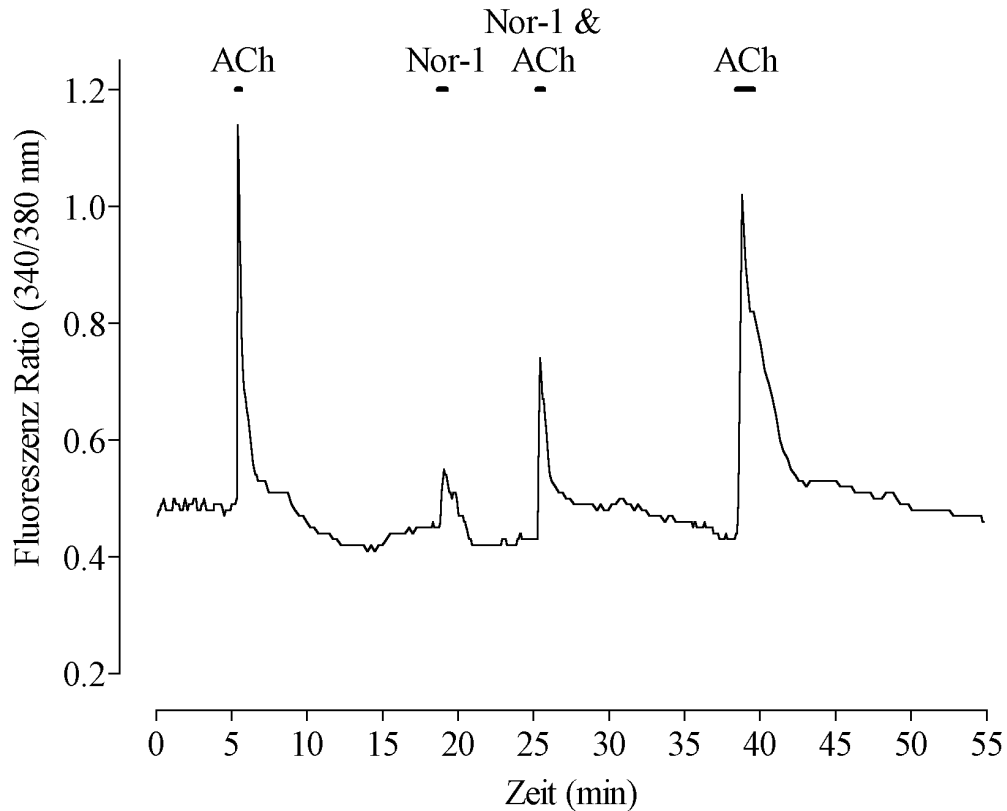


Abbildung 75 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des Ganglion sphenopalatinum nach Stimulation mit Acetylcholin, Nor-1, ACh co-appliziert mit Nor-1 und einem ACh-Kontrollstimulus

Die Ratioerhöhung nach Co-Applikation von Nor-1 und ACh unterschied sich nicht signifikant von der nach Stimulation mit ACh alleine. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 6$ Zellen.

3.3.4.3 Vinyl-L-NIO

Mit Vinyl-L-NIO, einem spezifischen Antagonisten der zytoplasmatischen, neuronalen (nicht jedoch endothelialen oder immunologisch aktiven) Isoform des Enzyms nNOS (Babu and Griffith 1998, Bretscher et al. 2003), sollte untersucht werden, ob endogen vorhandenes NO einen Einfluss auf die Signalkaskade nach Stimulation mit ACh hat. Es ist davon auszugehen, dass wenige Sekunden nach der Applikation von Vinyl-L-NIO kein NO mehr in der Messkammer vorhanden ist. Dies liegt einerseits daran, dass NO wie bereits erwähnt (Kapitel 2.4.3.4.4) innerhalb weniger Sekunden zu Nitrit oder Nitrat oxidiert wird (Ueki et al. 2002), und

andererseits durch die kompetitive Hemmung der nNOS kein NO mehr synthetisiert wird. Demzufolge müsste sich ein eventueller Einfluss des NO auf die cholinerge Signaltransduktionskaskade nachweisen lassen, wenn die Zellen erst mit Vinyl-L-NIO inkubiert werden, und anschließend (bei Abwesenheit endogenen Stickstoffmonoxids) sofort mit Acetylcholin stimuliert werden.

Ein erster Stimulus mit Acetylcholin in einer Konzentration von 10^{-4} M/l bewirkte bei allen MOL2.3-positiven Zellen dieser Versuchsreihe einen Anstieg der basalen Fluoreszenz Ratio um $0,84 \pm 0,10$ (Abbildung 76A & B, a) ($n = 11$). Keine Zelle reagierte auf die alleinige Applikation von Vinyl-L-NIO (10^{-5} M/l) (Abbildung 76A & B, b). Nach Präinkubation der Zellen mit Vinyl-L-NIO konnte nach Stimulation mit ACh eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei allen Zellen beobachtet werden, welche einen Ratioanstieg von $0,70 \pm 0,08$ bewirkte (Abbildung 76A & B, c). Nachdem die Zellen das Ratio-Basalniveau wieder erreicht und über einige Zeit gehalten hatten, wurden sie erneut mit ACh stimuliert, um eine Postkontrolle messen zu können. Dies führte erneut bei allen untersuchten Zellen zu einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio, welche im Mittel $0,52 \pm 0,07$ betrug (Abbildung 76A & B, d). Interessanter Weise weicht die Ratioänderung, welche durch Stimulation mit ACh nach nNOS-Hemmung durch Vinyl-L-NIO bewirkt wurde, statistisch gesehen nicht signifikant von der Ratioänderung bei der ersten ACh-Stimulation ab ($2P > 0,05$). Dagegen ist der Anstieg der Ratio bei der letzten ACh-Applikation signifikant niedriger als bei der ersten ($2P \leq 0,05$).

Vinyl-L-NIO könnte also den Ca^{2+} -Einstrom nach Stimulation mit ACh langfristig negativ zu beeinflussen.

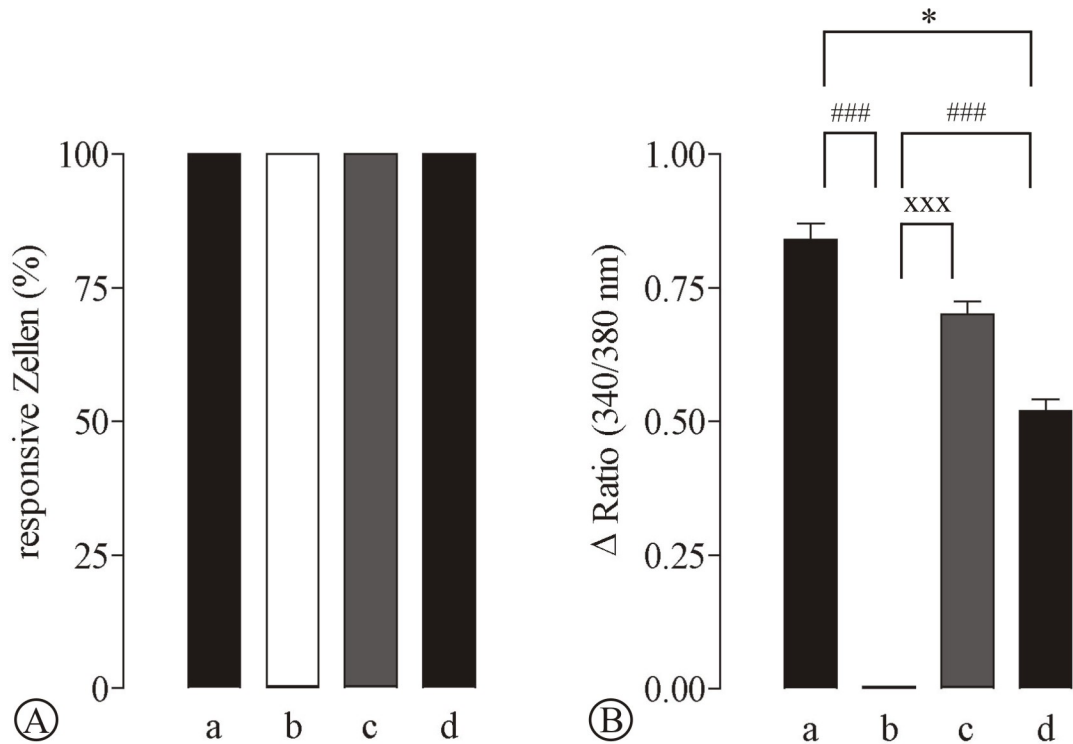


Abbildung 76 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und Vinyl-L-NIO

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), Vinyl-L-NIO (10^{-5} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) (n = 11).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), Vinyl-L-NIO (10^{-5} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider (n = 11).

* / # / x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* ($2P \leq 0,05$) und ### / xxx ($2P \leq 0,001$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

In dieser Versuchsreihe konnten weiterhin Daten für 11 MOL2.3-negative Zellen erhoben werden. Auch hier reagierten die Zellen zu 100 % auf Stimulation mit exogenem ACh einer Konzentration von 10^{-4} M/l, wobei die mittlere Ratioänderung $0,73 \pm 0,17$ betrug (Abbildung 77A & B, a). Vinyl-L-NIO (10^{-5} M/l) konnte bei keiner Zelle einen Calcium-Einstrom auslösen, eine Ratioänderung war demzufolge nicht quantifizierbar (Abbildung 77A & B, b). Nach Inkubation der Zellen mit Vinyl-L-NIO erhöhte sich die Fluoreszenz Ratio aller untersuchten Zellen um $0,70 \pm 0,14$, was kein signifikanter Unterschied ist gegenüber der ersten Stimulation mit ACh, der keine nNOS-Blockade vorausging (Abbildung 77A & B, c). Die abschließende Kontrollstimulation mit ACh bewirkte bei allen untersuchten Zellen einen Anstieg der Ratio um $0,50 \pm 0,11$ (Abbildung 77A & B, d). Dieser Wert

unterscheidet sich nicht signifikant von denen bei den vorausgegangenen Stimulationen mit ACh und ACh nach Vinyl-L-NIO-Applikation.

Auch hier scheint demzufolge ein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen feststellbar zu sein. Wo bei den MOL2.3-Rezeptor exprimierenden Zellen eine Blockade der endogenen nNOS einen langfristigen, hemmenden Effekt auf die cholinerge Signaltransduktionskaskade zu haben scheint, hat die nNOS-Hemmung bei den MOL2.3-negativen Zellen keinerlei Auswirkungen. Die Ratioänderungen weichen allerdings zwischen positiven und negativen Zellen nicht signifikant voneinander ab ($2P > 0,05$).

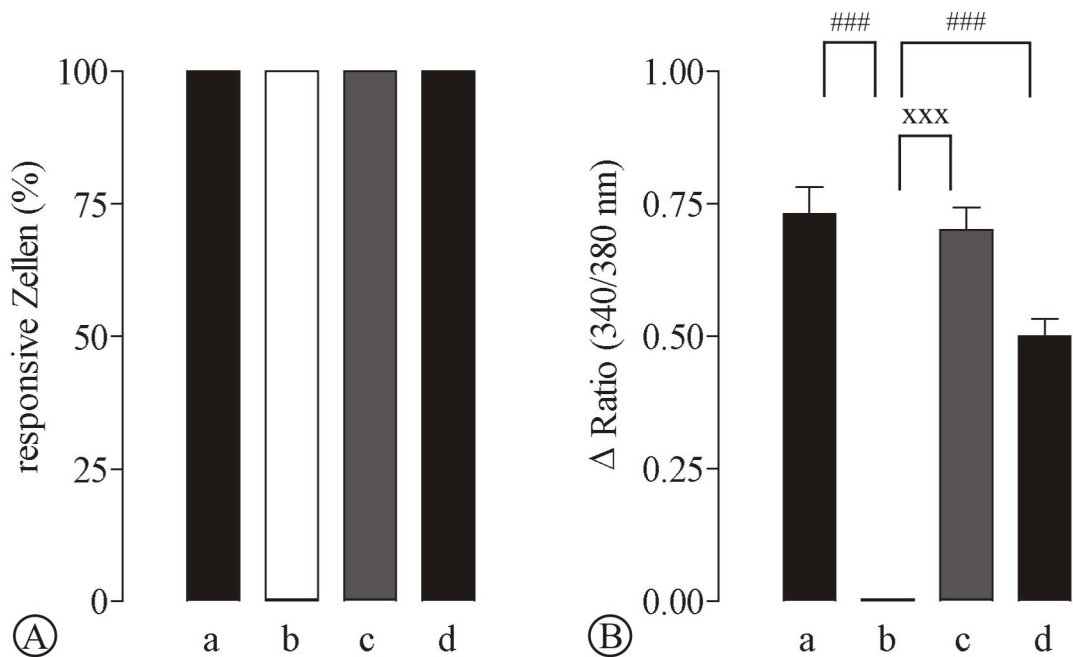


Abbildung 77 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und Vinyl-L-NIO

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), Vinyl-L-NIO (10^{-5} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 11$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), Vinyl-L-NIO (10^{-5} M/l) (b), ACh nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 11$).

/ xxx kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte ($2P \leq 0,001$). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Der in der folgenden Abbildung (Abbildung 78) dargestellte Graph zeigt das Antwortverhalten einer MOL2.3-positiven Zelle. Es ist deutlich zu sehen, dass die

Stimulation mit ACh zu Beginn des Versuchs, sowie die ACh-Applikation nach zweiminütiger Inkubation mit Vinyl-L-NIO zu etwa gleich großen Änderungen der Ratio führten. Der Stimulus am Ende des Versuchs mit ACh dagegen bewirkte einen deutlich geringeren Anstieg der Ratio, was auf einen langfristig hemmenden Effekt des Vinyl-L-NIO auf die cholinerge Signaltransduktion zurückzuführen sein könnte.

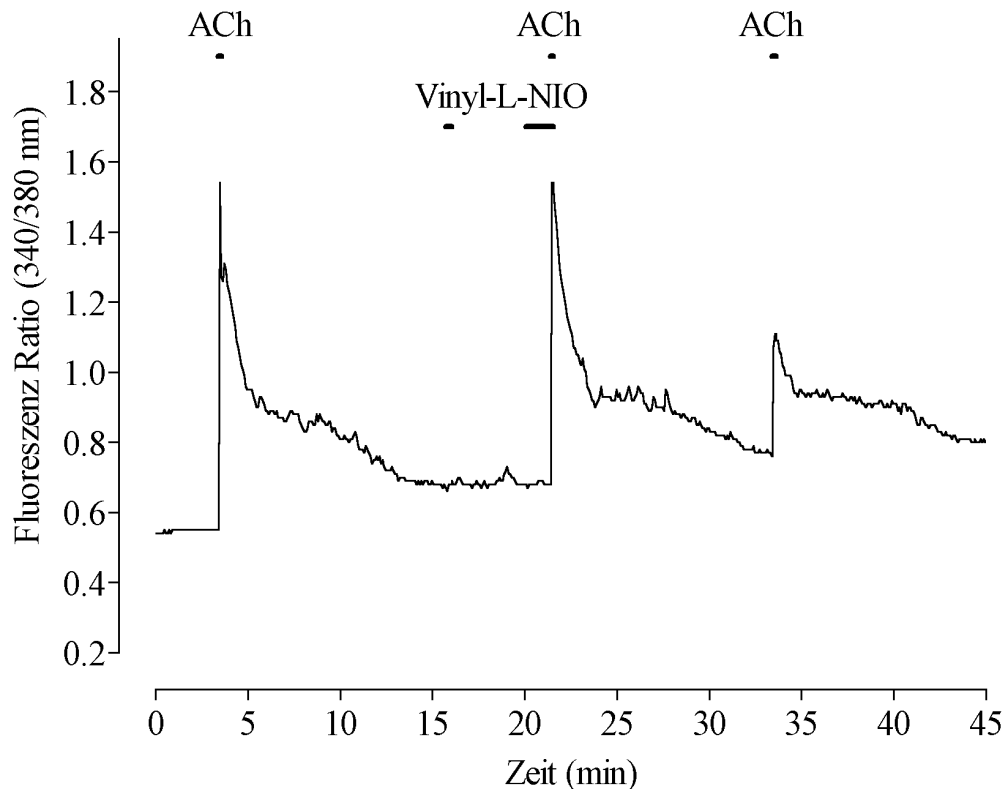


Abbildung 78 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin, dem nNOS-Blocker Vinyl-L-NIO, ACh nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO und einem ACh-Kontrollstimulus

Der Ratioanstieg nach cholinergem Stimulus wurde nach nNOS-Blockade mittels Vinyl-L-NIO langfristig vermindert. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 11$ Zellen.

3.3.5 PACAP

Bei PACAP handelt es sich nicht um einen klassischen Neurotransmitter, sondern um ein regulatorisches Polypeptid mit potentieller neuromodulatorischer Wirkung. Basierend auf den immunhistochemischen Versuchen dieser Arbeit, in denen die Expression von PACAP in MOL2.3-positiven wie –negativen Zellen gezeigt werden konnte (Kapitel 93), sollte nun die Responsivität der Zellen gegenüber Stimulation mit PACAP untersucht werden.

Bei den getesteten MOL2.3-positiven Zellen konnte zugegebenes PACAP in 40,4 % der Fälle eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auslösen (Abbildung 79A, a) ($n = 57$). Diese Erhöhung spiegelte sich in einer durchschnittlichen Ratioänderung von $0,25 \pm 0,05$ wider (Abbildung 79B, a) ($n = 23$). Bei den MOL2.3-negativen Zellen konnten ähnliche Werte ermittelt werden: So reagierten 11 der 23 Zellen (47,8 %) mit einem Ratio-Peak von $0,18 \pm 0,02$ (Abbildung 79A & B, b). Die Erhöhungen der Fluoreszenz Ratio wichen statistisch nicht signifikant voneinander ab, so dass im Hinblick auf das Antwortverhalten gegenüber Stimulation mit PACAP kein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen festgestellt werden konnte.

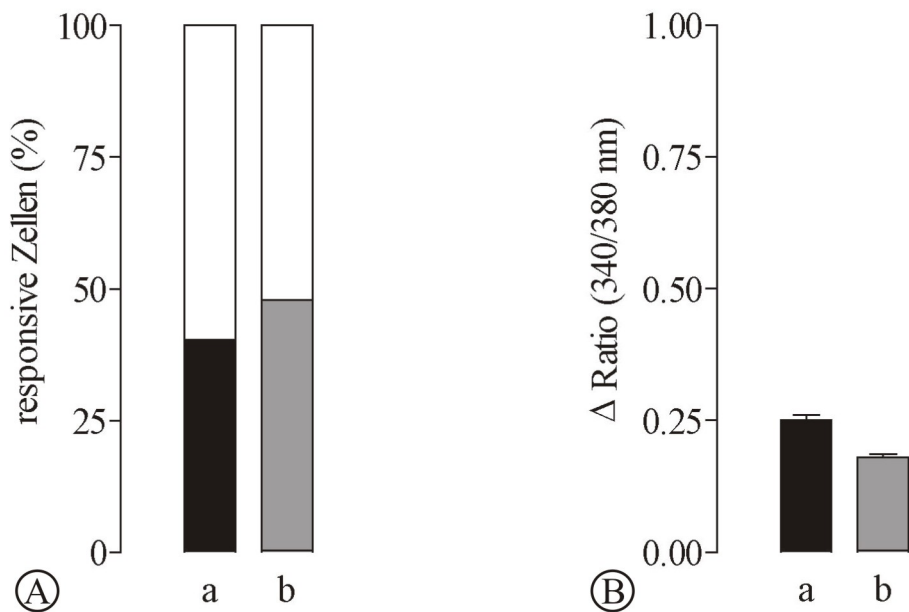


Abbildung 79 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit PACAP

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver (a) ($n = 57$) sowie -negativer (b) ($n = 23$) Zellen nach Stimulation mit PACAP einer Konzentration von 10^{-7} M/l

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden MOL2.3-positiven (a) ($n = 23$) bzw. -negativen (b) ($n = 11$) Zellen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. wider.

Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Ein für sowohl MOL2.3-positive als auch -negative Zellen typischer Ratio-Peak nach Stimulation mit PACAP soll in der folgenden Abbildung (Abbildung 80) gezeigt werden. Die maximale Ratioänderung der Zelle von 0,28 wurde innerhalb von 1-2 Sekunden nach Zugabe von PACAP gemessen. Von dem Maximum der

Kurve aus fiel die Fluoreszenz Ratio zunächst sehr schnell wieder um 0,21 ab, das Basalniveau der Ratio wurde erst nach längerer Zeit wieder erreicht (Abbildung 80, Abbildung 83).

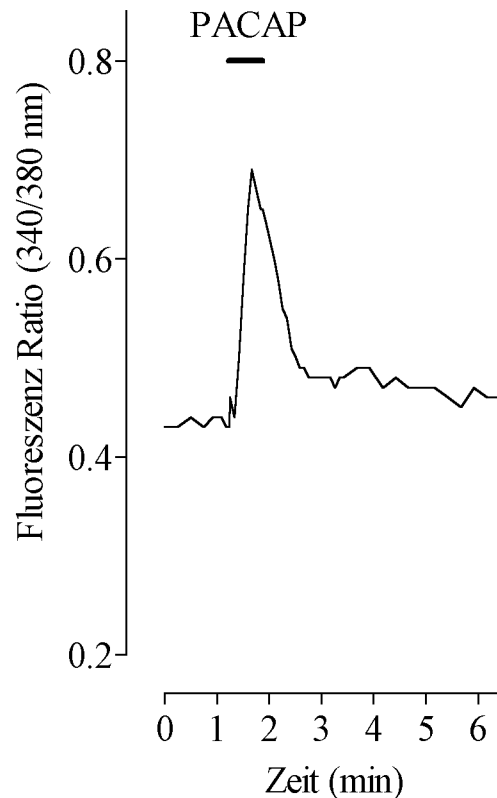


Abbildung 80 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit PACAP
Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für n = 23 Zellen.

Nachdem auch für PACAP gezeigt werden konnte, dass die Zellen des SPG responsiv für dieses Polypeptid sind, sollte überprüft werden, ob die intrazellulären Signalwege für PACAP und ACh interagieren.

Auf die initiale Bolusapplikation von ACh (10^{-4} M/l) hin war bei 96,3 % der Zellen ein mittlerer Ratioanstieg von $0,60 \pm 0,07$ (n = 28; $0,62 \pm 0,07$ bei den reagierenden Zellen, n = 27) messbar (Abbildung 81A & B, a) (n = 28). PACAP (10^{-7} M/l) alleine konnte bei 60,7 % der Zellen eine Calcium-Konzentrationserhöhung bewirken, welche in einem Ratioanstieg von $0,16 \pm 0,05$ (n = 28; $0,27 \pm 0,07$ bei den reagierenden Zellen, n = 17) resultierte (Abbildung 81A & B, b). Die gleichzeitige Applikation von PACAP und ACh ließ die Fluoreszenz Ratio von 89,3 % der untersuchten Zellen um $0,32 \pm 0,04$ (n = 28; $0,37 \pm 0,04$ bei den reagierenden Zellen, n = 25) ansteigen, was sich signifikant von den Werten der ersten cholinergen

Stimulation unterscheidet (Abbildung 81A & B, c). Die den Versuch abschließende Bolusapplikation von ACh alleine bewirkte, wie die vorangegangene Co-Stimulation, einen Ratioanstieg bei 89,3 % der 28 untersuchten Zellen (Abbildung 81A, d). Auch die Größe des Ratioanstiegs ($0,35 \pm 0,05$ ($n = 28$; $0,39 \pm 0,05$ bei den reagierenden Zellen, $n = 25$)) unterschied sich nicht signifikant von der vorherigen Stimulation ($2P > 0,05$).

Diese Versuche resultierten also in der Beobachtung, dass das regulatorische Polypeptid PACAP einen hemmenden Einfluss auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$, zu welcher es im Verlauf der cholinergen Signaltransduktionskaskade der MOL2.3-positiven Zellen kommt, hat.

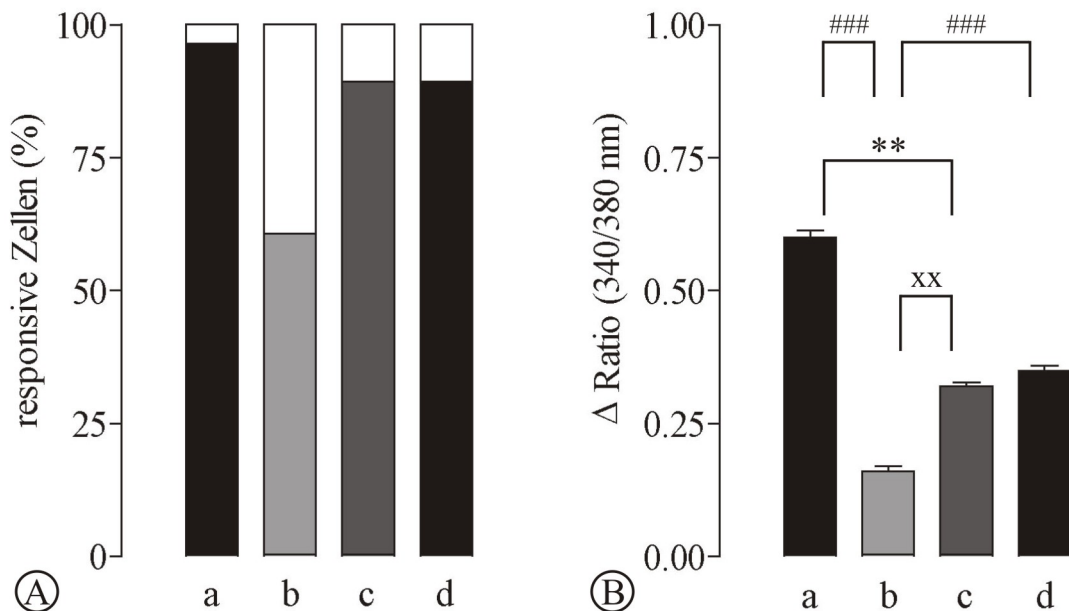


Abbildung 81 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und PACAP

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), PACAP (10^{-7} M/l) (b), ACh co-appliziert mit PACAP (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) ($n = 28$).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), PACAP (10^{-7} M/l) (b), ACh co-appliziert mit PACAP (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 28$).

* / # / x kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (** / xx ($2P \leq 0,01$) und *** ($2P \leq 0,001$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Die entsprechenden Versuche bei den MOL2.3-negativen Zellen ergaben folgende Werte: 90 % der Zellen reagierten mit einer Ratioänderung von $0,58 \pm 0,10$

(n = 10; $0,65 \pm 0,09$ bei den reagierenden Zellen, n = 9) auf den erst ACh-Stimulus (10^{-4} M/l) (Abbildung 82A & B, a) (n = 10). PACAP (10^{-7} M/l) alleine konnte bei 60 % der Zellen eine Reaktion in Form eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auslösen, während dies bei PACAP in Kombination mit ACh bei 80 % der untersuchten Zellen der Fall war (Abbildung 82A, b & c). Der Anstieg der Fluoreszenz Ratio lag bei PACAP bei $0,10 \pm 0,03$ (n = 10; $0,17 \pm 0,03$ bei den reagierenden Zellen, n = 6), bei PACAP zusammen mit ACh dagegen bei $0,27 \pm 0,07$ (n = 10; $0,34 \pm 0,07$ bei den reagierenden Zellen, n = 8) (Abbildung 82B, b & c). Auf die finale Stimulation mit ACh als Bolus hin war eine Ratio-Erhöhung von $0,24 \pm 0,06$ (n = 10; $0,26 \pm 0,06$ bei den reagierenden Zellen, n = 9) bei insgesamt 90 % der Zellen messbar (Abbildung 82A & B, d). Statistisch gesehen wichen die Ratioänderungen sowohl nach der Co-Stimulation von PACAP und ACh, als auch nach der letzten ACh-Stimulation, signifikant von der bei der ersten Applikation mit ACh ab ($2P \leq 0,05$). Demzufolge ist davon auszugehen, dass PACAP auch bei den MOL2.3-negativen Zellen den Calcium-Einstrom nach cholinergischer Stimulation hemmt. Diese Hemmung hält bei den negativen Zellen länger an als bei den positiven.

Bei der Größe der Ratioänderungen lässt sich statistisch kein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen errechnen ($2P > 0,05$).

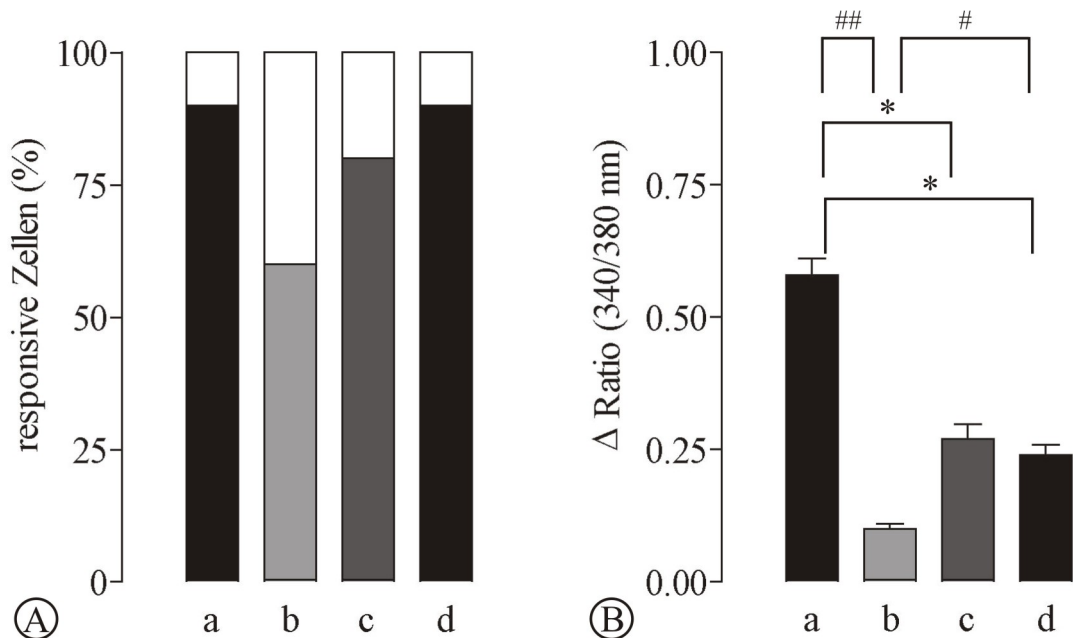


Abbildung 82 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und PACAP

Balkendiagramm A zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-negativer Zellen nach Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) (a), PACAP (10^{-7} M/l) (b), ACh co-appliziert mit PACAP (c) und einem ACh-Kontrollstimulus (d) (n = 10).

Diagramm B gibt die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Applikation von ACh (10^{-4} M/l) (a), PACAP (10^{-7} M/l) (b), ACh co-appliziert mit PACAP (c) und ACh (d) als arithmetischen Mittelwert \pm S.E.M. wider ($n = 10$).

* / # kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen der einzelnen Versuchsabschnitte (* /# ($2P \leq 0,001$) und ## ($2P \leq 0,01$)). Die Ratioänderungen nach den unterschiedlichen Stimulationen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Ranking Test verglichen.

Da die Substanzen als Bolus appliziert wurden, stieg die Fluoreszenz Ratio nach Stimulation mit ACh unmittelbar nach Zugabe bis zu ihrem Maximum an. Der Abfall der Ratio erfolgte direkt nach dem Maximum der Kurve. Auch nachdem PACAP als Bolus in die Messkammer pipettiert wurde, konnte ein steiler Ratioanstieg beobachtet werden. Dieser fiel allerdings nur sehr langsam ab, so dass das Basalniveau der Ratio erst nach einigen Minuten wieder erreicht wurde. Wurde PACAP dagegen mit ACh co-appliziert, so sah die Form des Ratio-Peaks sehr ähnlich der nach alleiniger Stimulation mit ACh aus: Die Ratio stieg sofort auf ihren maximalen Werte an, und fiel danach unmittelbar wieder auf den Ausgangswert ab.

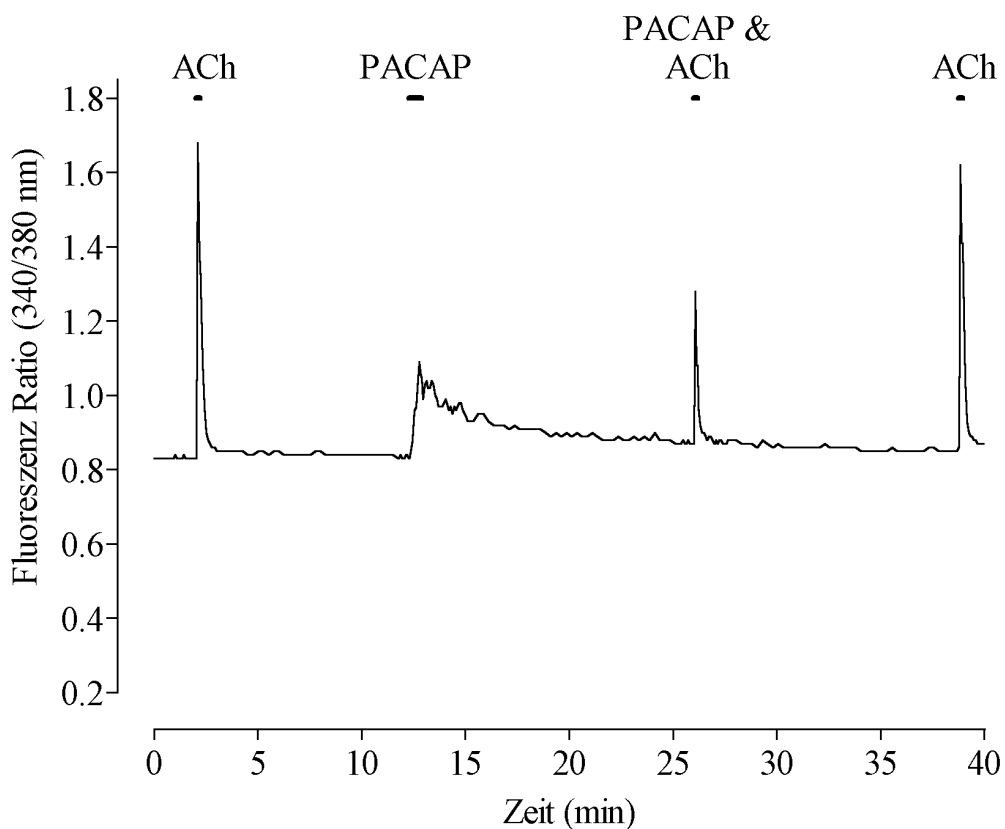


Abbildung 83 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Acetylcholin, PACAP, ACh co-appliziert mit PACAP und einem ACh-Kontrollstimulus

Verglichen mit dem Ratioanstieg nach cholinergem Stimulation war der Anstieg der Ratio nach Co-Applikation von ACh mit PACAP signifikant vermindert. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 10$ Zellen.

3.3.6 Noradrenalin

20 MOL2.3-positive Zellen wurden mit dem sympathischen Überträgerstoff Noradrenalin (NA) in einer Konzentration von 10^{-4} M/l superfundiert. Bei keiner dieser Zellen konnte eine Erhöhung der Fluoreszenz Ratio beobachtet werden (Abbildung 84).

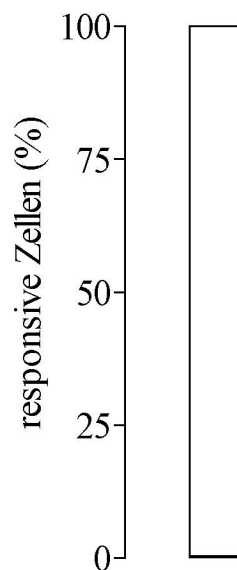


Abbildung 84 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Noradrenalin

Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit Noradrenalin einer Konzentration von 10^{-4} M/l ($n = 20$).

Der Graph in Abbildung 85 zeigt deutlich, dass die Fluoreszenz Ratio der Zelle nach Zugabe von Noradrenalin auf Basalniveau blieb. Als Erklärung hierzu kommen zwei Möglichkeiten in Frage: Zum einen kann es sein, dass die entsprechende Zelle keine Rezeptoren für das eingesetzte Noradrenalin exprimiert, zum anderen war die Zelle unter Umständen bei der Präparation oder der Dissoziation so beschädigt worden, dass sie nicht mehr vital war. Um dies zu kontrollieren, wurden alle Zellen nach der Noradrenalin-Applikation mit High-Kalium Puffer (100 mM K^+) superfundiert. Da auf diesen Stimulus hin eine Erhöhung der Fluoreszenz Ratio

messbar war, ist davon auszugehen, dass die Zelle auch zum Zeitpunkt der NA-Applikation noch vital war, und demzufolge keine Adrenoceptoren besitzt.

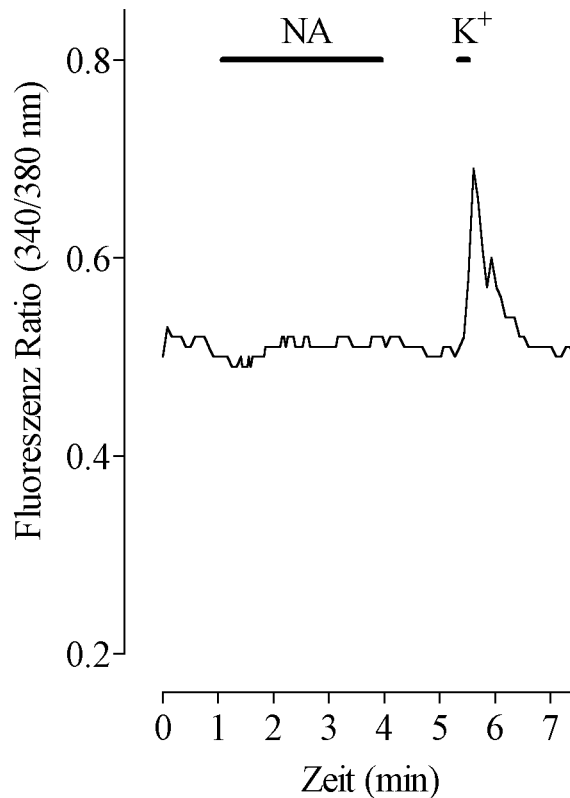


Abbildung 85 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Noradrenalin

Noradrenalin bewirkte keine Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio der Zelle, der Kontrollstimulus mit Kalium dagegen schon. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 20$ Zellen.

3.3.7 Glutamat

In der Versuchsreihe, in der Glutamat (Glu) in einer Konzentration von 10^{-3} M/l als Stimulus verwendet wurde, reagierte ebenfalls keine Zelle (Abbildung 86).

Auch diese Zellen wurden nach ausgebliebener Zellantwort auf den Glutamat-Stimulus mit High-Kalium Puffer superfundiert. Die hohe K^{+} -Konzentration bewirkte bei allen Zellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welche sich in einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio widerspiegelte (Abbildung 87).

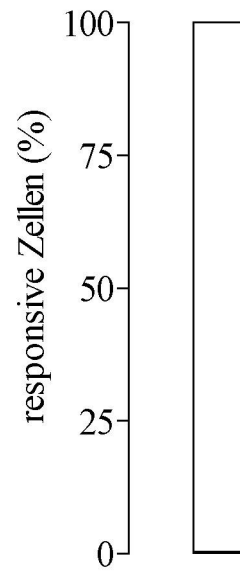


Abbildung 86 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Glutamat

Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil responsiver MOL2.3-positiver Zellen nach Stimulation mit Glutamat einer Konzentration von 10^{-3} M/l (n = 20).

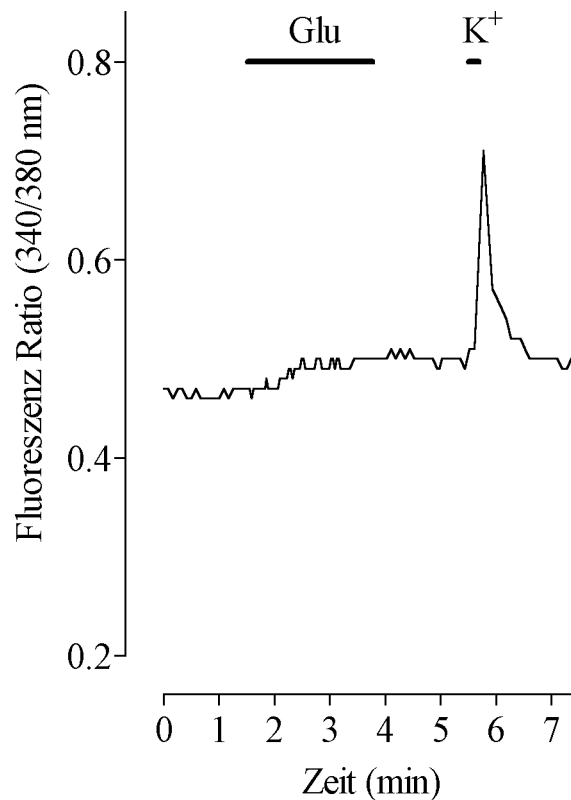


Abbildung 87 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des *Ganglion sphenopalatinum* nach Stimulation mit Glutamat

Glutamat bewirkte keine Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio der Zelle, der Kontrollstimulus mit Kalium dagegen schon. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 20$ Zellen.

3.4. Übersicht über die Unterschiede zwischen MOL2.3-positiven und –negativen Zellen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MOL2.3-positiven und –negativen Zellpopulationen sich nur in wenigen Punkten voneinander unterscheiden.

Bei den Versuchsreihen, in denen die Zellen auf ihr Antwortverhalten gegenüber cholinergem Stimulation untersucht wurden stellte sich heraus, dass die MOL2.3-negativen Zellen auf Stimulation mit ACh (10^{-4} M/l) weniger stark reagierten als die –positiven. Sowohl der prozentuale Anteil responsiver Zellen als auch die durchschnittliche Ratioänderung der MOL2.3-negativen Zellen war den –positiven Zellen gegenüber erniedrigt (Kapitel 3.3.2.1).

Extrazelluläres ACh bewirkte bei 25 % der MOL2.3-negativen Zellen einen Ratioanstieg bei Abwesenheit extrazellulären Calciums, dagegen nur bei 5 % der –positiven Zellen (Kapitel 3.3.2.4).

Die Responsivität der MOL2.3-positiven Zellen auf cholinerge Stimulation nach Blockade der $\alpha 7$ nAChR mit MLA war größer als die der –negativen Zellen. Auch die Ratioerhöhung der positiven Zellen wich, im Gegensatz zu der der negativen Zellen, nicht signifikant von der Erhöhung nach Stimulation mit ACh alleine ab (Kapitel 3.3.2.6.1).

Das ω -Conotoxin MVIIC, ein Blocker $\alpha 3\beta 4$ nAChR, konnte bei den MOL2.3-negativen Zellen den Ratioanstieg nach cholinenger Stimulation vermindern. Bei beiden Zellgruppen blockierte das Toxin bei einigen Zellen den Ca^{2+} -Einstrom nach Stimulation mit ACh vollständig (Kapitel 3.3.2.6.2).

Stimulation mit ACh bei gleichzeitiger Gabe des N-Typ Ca^{2+} -Kanal Blockers ω -Conotoxin MVIIA bewirkte bei den MOL2.3-negativen Zellen eine insgesamt geringere Ratioerhöhung als bei den positiven Zellen. Wenige negative Zellen zeigten nach der Blockade gar keinen Anstieg der Ratio mehr. Allerdings hatte das Toxin bei beiden Zellpopulationen keinen signifikanten Einfluss auf die cholinerge Signaltransduktion. Dieses Ergebnis deckt sich also mit dem, dass die negativen insgesamt etwas weniger responsiv sind als die positiven Zellen (Kapitel 3.3.3.1).

Auf Stimulation mit dem NO-Donor DEA reagierten die MOL2.3-negativen Zellen deutlicher als die –positiven. Außerdem scheint DEA bei den MOL2.3-positiven Zellen einen hemmenden Einfluss auf den Ca^{2+} -Einstrom nach cholinenger Stimulation zu haben (Kapitel 3.3.4.1).

Der nNOS-Blocker Vinyl-L-NIO hat bei den MOL2.3-positiven Zellen einen langfristig hemmenden Effekt auf die cholinerge Signaltransduktion, was bei den –negativen weniger ausgeprägt schien (Kapitel 3.3.4.3).

PACAP bewirkte sowohl bei den MOL2.3-positiven als auch –negativen Zellen eine Verminderung des Ca^{2+} -Einstroms nach Stimulation mit ACh. Bei den negativen Zellen scheint diese Hemmung längerfristig zu sein als bei den positiven Zellen (Kapitel 3.3.5).

Kapitel 4: Diskussion

Bei der Maus stellt sich das vegetative *Ganglion sphenopalatinum* (SPG) als einheitliches Gebilde dar, wie es auch für den Fleischfresser beschrieben ist (Nickel et al. 1992). Bei Schwein, Wiederkäuer und Pferd dagegen gibt es mehrere kleine Ganglien (Cuthbertson et al. 1997, Nickel et al. 1992), und es wäre denkbar, dass bei diesen Haustierspezies funktionell differenzierte Makro- und Mikroganglien existieren, welche sich durch eine unterschiedliche Rezeptor- und Transmitterausstattung sowie reziproke nervale Verschaltung auszeichnen. Da bei der Maus, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, spezifische Marker für die verschiedenen Neurotransmitter- und -modulatoren gleichmäßig über das gesamte Ganglion verteilt waren (Kapitel 3.1.2), ist bei dieser Spezies davon auszugehen, dass das SPG als eine funktionelle Einheit angesehen werden kann.

4.1 Das cholinerge System

Beim SPG handelt es sich um ein parasympathisches Ganglion, dessen postganglionäre Neurone in erster Linie cholinerge Nervenzellen darstellen (Forth et al. 2001). Der aus der Familie der olfaktorischen, G-Protein gekoppelten Rezeptorproteine stammende MOL2.3-Rezeptor wird den quantitativen immunhistochemischen Studien dieser Arbeit zufolge fast ausschließlich in diesen neuronalen Zellen des SPG exprimiert; er konnte in etwa der Hälfte der Neurone des Ganglions anhand seiner GFP-Markierung detektiert werden (Kapitel 3.1.3). Bislang wurde für verschiedene Tierarten gezeigt, dass die ganglionären Zellen die cholinergen Marker ChAT oder VACHT exprimieren (Hara et al. 1985, Kimura et al. 1997, Liu et al. 2000a, Suzuki et al. 1990c, Suzuki et al. 1989, 1990a, Yu et al. 1998). Auch für die Maus konnte in dieser Arbeit erwartungsgemäß nachgewiesen werden, dass die Neurone der sphenopalatinalen Ganglien eindeutig cholinerg sind, da fast alle Zellen immunreaktiv für ChAT und VACHT, Schlüsselenzyme des cholinergen Systems, waren. Sowohl cholinerge als auch nicht-cholinerge, MOL2.3-positive wie -negative Zellen wurden zudem von VACHT-positiven cholinergen synaptischen Endigungen innerviert (Kapitel 3.1.4, 3.1.5). Diese Innervation kann sowohl von anderen cholinergen Zellen des SPG stammen als auch von präganglionären, parasympathischen Neuronen aus zentralen Kerngebieten des SPG (Zhu et al. 1997). Rezeptoren für das aus den cholinergen Endigungen freigesetzte Acetylcholin befinden sich den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge auf nahezu allen postganglionären Neuronen des SPG, da die Zellen fast ausnahmslos auf extrazellulär appliziertes ACh mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration reagierten (Kapitel 3.3.2.1). Die

Calciumkonzentrationserhöhung erwies sich als streng dosisabhängig (Kapitel 3.3.2.2), wobei es offensichtlich keine Rolle spielte, ob die cholinerg innervierten Zellen selbst cholinerg waren. Es ist auch nicht auszuschließen, dass in der präsynaptischen Membran solch cholinergischer Nervterminalen Autorezeptoren für ACh exprimiert sind, welche die cholinerge Signalkette positiv oder negativ modulieren (D'Agostino et al. 2000, Fu et al. 1998, Girod et al. 2000, Kitaichi et al. 1999, Lee et al. 2001, Marchi et al. 1999, Re 1999, Rouse et al. 2000, Skok 2002). Außerdem könnten präsynaptische ACh-Rezeptoren parakrin-retrograd durch ACh aus nachgeschalteten, postganglionären Zellen stimuliert werden, wobei auch hier positive oder negative Rückkopplungsmechanismen denkbar sind.

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in den ganglionären Zellen nach Stimulation mit einem cholinergen Agonisten basierte fast ausschließlich auf dem Einstrom extrazellulären Calciums in die Zellen. Nur bei einigen wenigen Zellen schien eine geringe Menge Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt zu werden (Kapitel 3.3.2.4).

Die Tatsache, dass es Zellen gibt, welche ausschließlich nicotinerge oder muscarinerge Acetylcholinrezeptoren exprimieren, und Zellen, in denen beide Rezeptor-Subtypen gleichzeitig vorkommen (Tohyama and Takatsuji 1998), gilt auch für das SPG. So konnte mit den Calcium-Imaging Versuchen dieser Studie gezeigt werden, dass es in diesem Ganglion überwiegend Zellen gab, die ausschließlich nAChR exprimierten, aber auch einige Zellen, in denen neben den nicotinergen zusätzlich muscarinerge Rezeptoren vorkamen. Keine der untersuchten Zellen exprimierte jedoch ausschließlich muscarinerge AChR (Kapitel 3.3.2.5). In der Literatur wird die Expression muscarinerger M_2 -Rezeptoren in hoher Dichte für das SPG der Ratte beschrieben (Liu et al. 2002). Die dargestellten, nicht kongruenten Befunde einer lediglich marginalen Präsenz funktioneller muscarinerger Rezeptoren in der vorliegenden Arbeit für das SPG der Maus und der hohen Dichte funktioneller M_2 -Rezeptoren im SPG der Ratte lassen sich zum einen durch die unterschiedliche Tierspezies erklären, zum anderen durch das Alter der in den Versuchen eingesetzten Tiere. Während die Mäuse in dieser Studie maximal 8 Tage alt waren, benutzten Liu et al. (2002) Ratten im Alter von 3-16 Wochen. Ein entscheidender Unterschied der beiden Untersuchungen bestand darin, dass Liu et al. Zellen einer Primärkultur nach 1-3-wöchiger Kultivierung in die Versuche einsetzten, während in der vorliegenden Studie frisch präparierte Zellen untersucht wurden. Da die Dauer der Kultivierung von Zellen bekanntermaßen einen Einfluss auf die Expression und die Funktionalität von Rezeptoren hat (Jurzak et al. 1995b), könnte die Rezeptorausstattung der kultivierten Zellen deutlich von den Verhältnissen *in vivo* abweichen. Hier bietet die für diese Arbeit etablierte Kurzkultur den Vorteil, dass die Ausstattung der Zellen mit Rezeptoren den *in vivo* Verhältnissen relativ nahe kommt. Der Nachteil akut

dissoziierter Zellen besteht darin, dass die verbleibende Zeit zur Regeneration von während der Präparation möglicherweise enzymatisch degenerierten Rezeptor- und Kanalproteinen limitiert ist.

Nicotinerge AChR sind - wie bereits erwähnt – pentamere Proteine, die aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind (Kulak et al. 2001, Ragozzino et al. 1998, Si and Lee 2001, Skok 2002). Unterschiedliche Subtypen der nAChR hinsichtlich ihrer pentameren Zusammensetzung sind zum einen für verschiedene vegetative Ganglien einer Spezies, zum anderen sogar für einzelne Neurone eines Ganglions beschrieben (Skok 2002). In autonomen Ganglien spielen vor allem heteromere $\alpha 3\beta 4$ Rezeptoren, welche auch als „Ganglien-Typ nAChR“ bezeichnet werden (Ragozzino et al. 1998), sowie homomere $\alpha 7$ Rezeptoren eine Rolle (Si and Lee 2001, Skok 2002). Beide Rezeptorsubtypen können prä- und postsynaptisch lokalisiert sein (Kulak et al. 2001, Si and Lee 2001). Mit Hilfe selektiver nAChR-Blocker konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass $\alpha 7$ nAChR sowohl in MOL2.3-positiven als auch –negativen Zellen des SPG exprimiert werden, während die Untereinheitszusammensetzung $\alpha 3\beta 4$ vorrangig in MOL2.3-negativen Zellen vorzukommen scheint (Kapitel 3.3.2.6). Eine eventuelle präsynaptische Lokalisation der Rezeptoren konnte nicht untersucht werden, da in den ganglionären Kulturen des SPG nur Zellen identifizierbar waren, nicht aber synaptische Endigungen. Für nicotinerge AChR im Allgemeinen wird eine ausgeprägte Ca^{2+} -Permeabilität postuliert (Adams and Nutter 1992, Girod et al. 2000, Gray et al. 1996, Rathouz et al. 1996, Rogers et al. 1997), wobei der Ca^{2+} -Strom durch $\alpha 7$ nAChR deutlich größer ist als derjenige durch $\alpha 3\beta 4$ nAChR (Girod et al. 2000, Gray et al. 1996, Skok 2002). In den Calcium-Imaging Studien dieser Arbeit zeigte sich, dass bei den MOL2.3-negativen Zellen die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch ACh nach Blockade der $\alpha 7$ nAChR in einem größeren Ausmaß gehemmt wurde als nach Blockade der $\alpha 3\beta 4$ Rezeptoren. Die könnte zum einen dafür sprechen, dass der Anteil nicotinerger $\alpha 7$ Rezeptoren größer ist als der der $\alpha 3\beta 4$ Rezeptoren, zum anderen könnte das Ergebnis darauf basieren, dass $\alpha 7$ nAChR besser permeabel für Calcium sind als $\alpha 3\beta 4$ Rezeptoren. So würde bei etwa gleicher Anzahl der beiden Rezeptor-Subtypen der Ca^{2+} -Einstrom nach Blockade von $\alpha 7$ Rezeptoren deutlicher sinken als nach $\alpha 3\beta 4$ nAChR-Blockade.

Für $\alpha 7$ nAChR ist unter anderem eine schnelle Desensibilisierung charakteristisch (Girod et al. 2000, Gray et al. 1996, Skok 2002). Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Wiederholungsstimulationen mit ACh einer konstanten Konzentration konnte eindeutig gezeigt werden, dass es bei den ganglionären Zellen nicht zu einer Desensibilisierung kommt (Kapitel 3.3.2.3). Im Falle der MOL2.3-negativen Zellen könnte eine etwaige Desensibilisierung der $\alpha 7$ Rezeptoren unter Umständen durch $\alpha 3\beta 4$ Rezeptoren kompensiert werden, bei den MOL2.3-positiven

Zellen kommt eine solche Kompensation allerdings nicht in Frage, da diese den Ergebnissen dieser Studie zu Folge keine oder lediglich eine geringe Anzahl an funktionellen $\alpha\beta4$ nAChR exprimierten.

Der Einstrom extrazellulären Calciums in die Zellen kann zum einen direkt durch die AChR erfolgen oder sekundär durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle. Da in der Literatur beschrieben wird, dass der Calcium-Einstrom durch nAChR die Leitfähigkeit anderer Ionenkanäle reguliert, wäre es durchaus denkbar, dass es nAChR-bedingt zu Prädepolarisationen der Zelle kam, welche sekundär die Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle bewirkten (Mulle et al. 1992). Liu et al. (2000c) konnten immunhistochemisch und zellphysiologisch die Expression und Funktionalität spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle des N-Typs in einer Zellkultur des SPG der Ratte zeigen. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Ca^{2+} -Kanäle des N-Typs, sofern diese auch im SPG der Maus exprimiert werden, nicht sekundär durch die Aktivierung nicotinerger AChR geöffnet wurden. Dagegen existierten Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs in den postganglionären Zellen des SPG, deren Blockade in einem herabgesetzten Calcium-Signal nach cholinерger Stimulation resultierte (Kapitel 3.3.3).

Weder die alleinige Blockade der nAChR-Subtypen $\alpha\beta4$ und $\alpha7$, noch die Blockade lediglich der Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs konnten den Calcium-Einstrom nach cholinерger Stimulation vollständig unterbinden. Folglich ist davon auszugehen, dass extrazelluläres Calcium sowohl in den MOL2.3-positiven als auch –negativen Zellen des SPG summarisch (a) direkt über die nAChR und (b) zusätzlich durch die indirekte Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle nach intrazellulär gelangte.

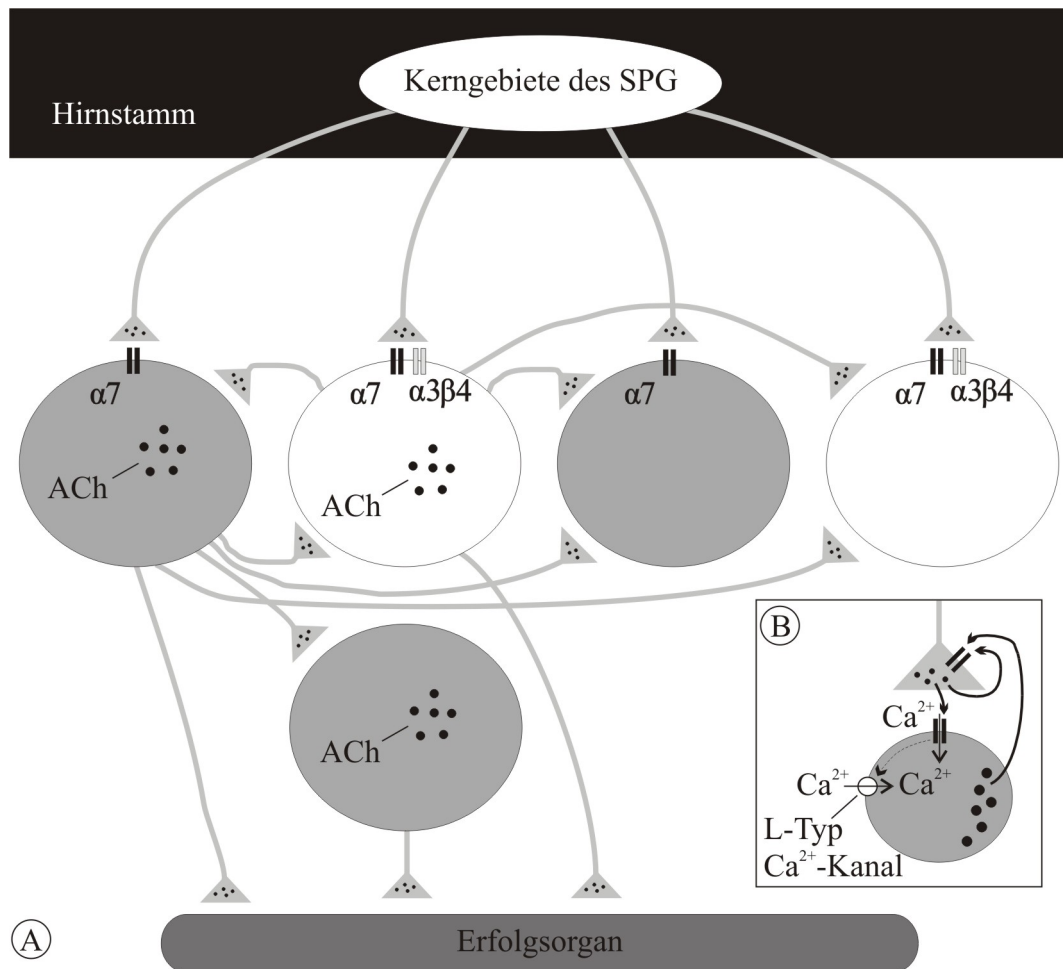


Abbildung 88: Das cholinerge System im *Ganglion sphenopalatinum*

Die schematische Abbildung A zeigt, dass innerhalb des SPG sowohl MOL2.3-positive (grau) als auch -negative Zellen (weiß) cholinerg sind. Die überwiegend nicotinergen Acetylcholin-Rezeptoren der ganglionären Zellen (egal ob MOL2.3-positiv oder -negativ bzw. cholinerg oder nicht-cholinerg) können durch ACh aus übergeordneten Kerngebieten des Hirnstamms oder aus postganglionären Zellen stimuliert werden. In den MOL2.3-positiven Zellen werden nur $\alpha 7$ nAChR exprimiert, in den -negativen zusätzlich $\alpha 3\beta 4$.

In Abbildung B ist zu sehen, dass ACh aus postganglionären Zellen unter Umständen auch retrograd präsynaptische AChR stimulieren kann. Außerdem ist hier dargestellt, dass Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum über die nAChR in die Zellen einströmt, sowie zusätzlich über sekundär geöffnete spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs.

4.2 Das nitrerge System und dessen Interaktion mit dem cholinergen System

NO spielt im autonomen Nervensystem eine wichtige Rolle als nicht-adrenerger, nicht cholinerg (NANC) Neurotransmitter (Bredt 1999). Im Gegensatz zu den klassischen chemischen Neurotransmittern Acetylcholin und Noradrenalin kann NO Informationen nicht nur an distinkten *Loci* (Synapsen) unidirektional übertragen, sondern aufgrund seiner hochdiffusiblen Eigenschaften dreidimensional und

unabhängig von Synapsen, Membranen oder Transportern (Garthwaite and Boulton 1995). Die nNOS findet sich oft co-lokalisiert mit klassischen Neurotransmittern; im ZNS beispielsweise reguliert NO inhibitorische und exzitatorische sympathische und parasympathische Effekte in verschiedenen autonomen Zentren (Krukoff 1999). In den Vorversuchen dieser Arbeit konnte die Expression der nNOS in vegetativen Kerngebieten des Hirnstamms der Ratte und der Maus gezeigt werden (Kapitel 3.1.1), was einen Hinweis auf die regulatorische Funktion von NO in diesen autonomen Zentren liefert. Beim Kaninchen konnte nNOS als generierendes Schlüsselenzym des volatilen Botenstoffes NO innerhalb des ZNS unter anderem in präganglionären, parasympathischen Neuronen des Hirnstamms lokalisiert werden, welche zum SPG projizieren (Zhu et al. 1997). Von der Ratte (Edvinsson et al. 2001, Hanazawa et al. 1994, Lee et al. 1995a, Lee et al. 1995b, Liu et al. 2000c, Morris et al. 1993, Uddman et al. 1998), der Katze (Goadsby et al. 1996, Kimura et al. 1997), dem Kaninchen (Runer et al. 1998), dem Meerschweinchen (Shimizu et al. 2001), dem Schwein (Yu et al. 1997, Yu et al. 1998) und dem Menschen (Uddman et al. 1999) ist bekannt, dass nNOS auch in Neuronen des SPG exprimiert wird. Bei der MOL2.3-IGITL Maus erwiesen sich $\frac{3}{4}$ aller MOL2.3-positiven Zellen als nitrerg, und etwa 85 % der nitrergen Zellen als GFP-positiv (Kapitel 3.1.6), so dass davon auszugehen ist, dass der größte Teil der nitrergen Zellen den *orphan* Rezeptor MOL2.3 exprimiert. Außerdem zeigte sich, dass etwa 75 % aller cholinergen Zellen auch nitrerg sind, und die nitrergen Zellen fast ausnahmslos cholinerg. Eine Innervation mit VAcHT-immunreaktiven Synapsen konnte bei fast allen cholinergen und/oder nitrergen Zellen festgestellt werden (Kapitel 3.1.7).

Für das in den ganglionären Zellen gebildete NO wurde von verschiedenen Autoren postuliert, dass es eine zentrale Rolle bei der neurovaskulären Kontrolle verschiedener cranialer Blutgefäße spielt (Goadsby et al. 1996, Hanazawa et al. 1997, Jeon et al. 1997, Kimura et al. 1997, Kondo et al. 2000, Lacroix et al. 1998, Lee et al. 1995b, Nozaki et al. 1993, Okamura et al. 2002, Toda et al. 2000a, Toda et al. 1993, Toda and Okamura 1996, Yamamoto et al. 1993). Insbesondere an Blutgefäßen des *Circulus arteriosus cerebri* und anderen cerebralen Blutgefäßen (Edvinsson et al. 2001, Goadsby et al. 1996, Kimura et al. 1997, Nozaki et al. 1993, Okamura et al. 2002, Toda et al. 1993, Toda and Okamura 1996, Toda et al. 2000b), an der *Arteria ophthalmica* (Elsas et al. 1996b) und choroidalen sowie retinalen Arterien des Auges (Toda et al. 1993, Yamamoto et al. 1993) übt NO eine vasodilatatorische Funktion aus. Auch an der vaskulären und sekretorischen Kontrolle der respiratorischen Nasenschleimhaut, der Nasendrüsen und der Blutgefäße in der Nasenschleimhaut ist NO beteiligt (Hanazawa et al. 1994, Jeon et al. 1997, Kondo et al. 2000, Lacroix et al. 1998, Lee et al. 1995b). Die massive Anhäufung des NO-synthetisierenden Enzyms nNOS in neuronalen Zellen des SPG

der Maus spricht dafür, dass die oben genannten, vom SPG innervierten Gewebe auch bei dieser Tierart nitroerg innerviert werden. In Zellkulturen des Hippocampus der Ratte zeigte sich, dass NO bei langfristigen Reaktionen auch als retrograder Botenstoff agieren kann. NO wird dort in postsynaptischen Zellen synthetisiert, diffundiert durch den Extrazellulärraum und beeinflusst vorgeschaltete Neurone (Arancio et al. 1996), ein Mechanismus, der auch im SPG in ähnlicher Weise funktionieren könnte.

Bei Stimulation isolierter Neurone des SPG der MOL2.3-IGITL Maus konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass der überwiegende Teil der ganglionären Zellen NO-responsiv war (Kapitel 3.3.4.1, 3.3.4.2). Der aus exogen zugegebenen NO-Donoren freigesetzte atypische Neuromodulator diffundiert demzufolge in die untersuchten Zellen (Lancaster 1997) und bewirkt dort einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Herkunft des ins Zytoplasma strömenden Calciums nach Stimulation mit NO-Donoren wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. NO kann Ca^{2+} aus Mitochondrien freisetzen (Horn et al. 2002), oder spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L- und P-Typs öffnen (Ohkuma et al. 1998). Wie in dieser Studie schon für ACh beschrieben, wäre es denkbar, dass auch NO die Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs der Neurone des SPG öffnet. *In vivo* könnte NO sowohl aus synaptischen Endigungen präganglionärer Neurone stammen (Zhu et al. 1997) als auch aus postganglionären Zellen des SPG.

Das nitroerge Markerenzym nNOS ist in präganglionären Kerngebieten des SPG wie auch im SPG selbst mit cholinergen Markern [ChAT im Hirnstamm (Zhu et al. 1997); ChAT und VACHT im SPG, eigene Ergebnisse] co-lokalisiert. Somit ist eine Interaktion der cholinergen und nitrogenen Transmission prä-, intra- und postganglionärer Nervenendigungen und Neurone im SPG denkbar.

Der klassische Neurotransmitter ACh und der NANC-Transmitter NO könnten zeitgleich freigesetzt werden, und synergistische Effekte auf nachgeschaltete Zellen ausüben, wie z.B. die Relaxation glatter Muskelzellen in der cerebralen Zirkulation (Kimura et al. 1997, Morales et al. 1995).

Über den Einfluss von Acetylcholin auf das nitroerge System, insbesondere im SPG, gibt es verschiedene Hinweise. ACh moduliert bei der Innervation der cerebralen Vaskularisierung von Katze und Schwein durch das SPG die präsynaptische NO-Freisetzung, welche wiederum eine Vasodilatation bewirkt (Kimura et al. 1997, Yu et al. 1998). Die These wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, da die Innervation nitroerger Neurone durch cholinerge Zellen (prä- oder postganglionär) nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.1.7). Weiterhin zeigte sich bei den Calcium-Imaging Versuchen, dass cholinerge Stimulation ganglionärer Zellen, egal ob MOL2.3-positiv oder -negativ, zu einem signifikanten Einstrom extrazellulären Calciums führte (Kapitel 3.3.2.1). Die daraus resultierende Calcium-

Konzentrationserhöhung kann das in postganglionären Zellen lokalisierte, membranständige Enzym nNOS aktivieren, welches NO produziert (Boeckxstaens et al. 1993, Bredt and Snyder 1990, Evans et al. 1995, Wenisch et al. 2000). Der gleiche Mechanismus wird auch bezüglich der Vasodilatation der *Arteria ophthalmica* des Affen postuliert. Hier soll ACh aus Neuronen des Hirnstamms, welches über das *Ganglion geniculatum* zum SPG projizieren, die nervale NO-Freisetzung auslösen (Ayajiki et al. 2000). Liu et al. (2002) beschreiben die negative Beeinflussung der NO-Freisetzung aus präsynaptischen Nervenendigungen des SPG der Ratte durch ACh. ACh soll hier über die Aktivierung präsynaptischer M₂ AChR den Calcium-Einstrom durch N-Typ Calciumkanäle vermindern. Ohne Calcium kann die nNOS kein NO produzieren, so dass die cerebrale Vasodilatation gehemmt wird (Boeckxstaens et al. 1993, Bredt and Snyder 1990, Liu et al. 2000c). Die immunhistochemischen Doppelmarkierungen an sphenopalatinalen Ganglien der Maus weisen auf neuronale Co-Lokalisation der Marker ChAT bzw. VAcHT und nNOS hin (Kapitel 3.1.7). Solche cholinerg-nitrergen Neurone könnten im Sinne einer Autoregulation für den eben beschriebenen Mechanismus verantwortlich sein. Ebenso kann ACh aus benachbarten Synapsen, sei es von Neuronen des SPG oder aber anderer Herkunft, für diese Art der Modulation verantwortlich sein. Die beiden soeben beschriebenen Möglichkeiten der positiven sowie negativen Beeinflussung der NO-Bildung durch ACh widersprechen sich nicht. Die endogene nNOS postganglionärer Neurone des SPG kann durch ACh aus prä- oder intraganglionären Zellen aktiviert werden und NO produzieren, indem ACh über den Einstrom von Ca²⁺ durch den nAChR selbst und sekundär durch spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle des L-Typs zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt. Die für diese Signalkette notwendigen, Transmitter-synthetisierenden Enzyme und funktionellen Rezeptoren konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Wie bereits oben erwähnt, kann ACh in der Peripherie über die Aktivierung von M₂-Rezeptoren eine verminderte Bildung von NO bewirken, indem es einen Ca²⁺-Einstrom blockiert (Liu et al. 2002). Somit könnte ACh auf ganglionärer Ebene eine neurogen vermittelte Vasodilatation der vom SPG innervierten Blutgefäße bewirken, auf postganglionärer Ebene könnte ACh (unter Umständen aus Nerven, die nicht vom SPG kommen) diese Dilatation hemmen.

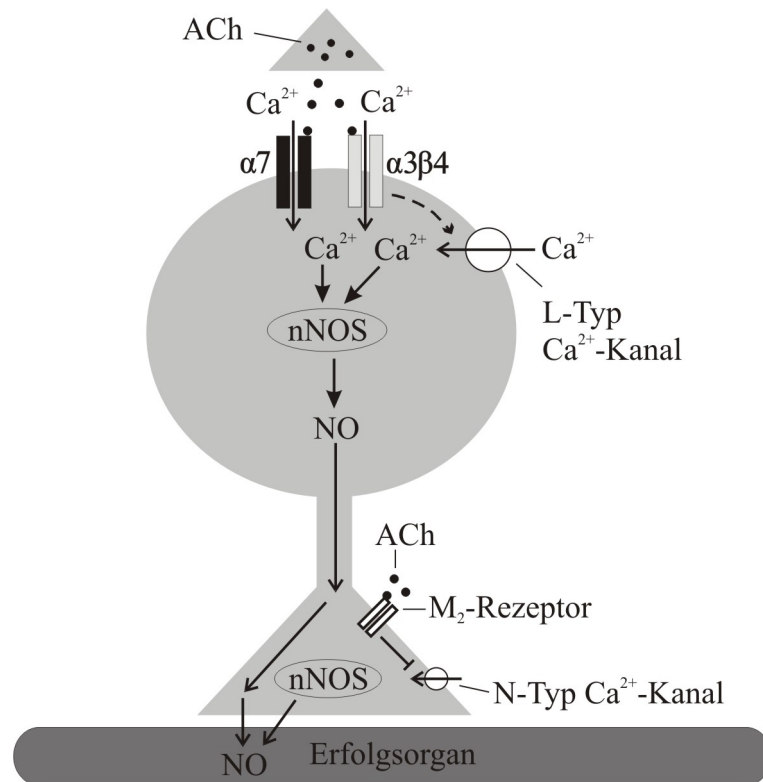


Abbildung 89: Der Einfluss von Acetylcholin auf die NO-Synthese

In postganglionären Neuronen des SPG bewirkt die Stimulation eines nAChR ($\alpha 7$ oder $\alpha 3\beta 4$) den Einstrom von Calcium in die Zelle. Ca^{2+} kann über den nAChR selbst oder durch sekundär geöffnete L-Typ Ca^{2+} -Kanäle ins Zytoplasma gelangen. Ca^{2+} aktiviert die nNOS, welche daraufhin NO produziert.

In den synaptischen Endigungen werden durch Bindung von ACh an M_2 -Rezeptoren N-Typ Ca^{2+} -Kanäle gehemmt, so dass kein Calcium in die Zelle gelangen kann. Somit kann auch die nNOS nicht aktiviert werden, NO zu bilden.

Auch in anderen neuronalen Strukturen wurden Hinweise auf eine Beeinflussung der nitrergen Signaltransduktion durch ACh gefunden. Beispielsweise induziert die nicotinerge Stimulation von $\alpha 7$ nAChR in Hinterwurzelganglien die Bildung und Freisetzung von NO. Dieser Effekt ist durch Blockade von $\alpha 7$ nAChR, nNOS und spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle hemmbar (Haberberger et al. 2003). Auch hier scheint es demzufolge einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung nicotinerger $\alpha 7$ Rezeptoren und der Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanälen zu geben, wie sie in dieser Arbeit für das SPG gezeigt werden konnte. In der Retina aktiviert ACh über nAChR den NO/cGMP-Signalweg (Blute et al. 2003). Eine durch Phenylepinephrin induzierte Vasokonstriktion in der Mikrozirkulation des Dünndarms vom Meerschweinchen wird indirekt durch ACh gehemmt, indem ACh die Freisetzung von NO bewirkt (Kotecha and Coffa 1999). Die Verminderung der NO-Bildung durch Stimulation von nAChR wird in Zellen einer corticalen Zellkultur der Ratte beschrieben (Sheng et al. 1993). Ebenso wird die NO-induzierte

Vasodilatation an Ciliar-Arterien des Schweines durch ACh aus cholinergen Nerven gehemmt (Toda et al. 1997).

Über einen modulierenden Einfluss des nitrergen Systems auf die cholinerge Signaltransduktion im SPG gibt es bislang keine Informationen. In der Retina der Ratte und im choroidalen Gewebe des Hühner-Embryos konnte die ACh-Freisetzung durch NO vermindert werden (Gray et al. 1999, Okada et al. 2001). In cholinergen Synapsen des *Ganglion buccale* von *Aplysia* dagegen bewirkt NO eine erhöhte ACh-Freisetzung. Auch im SPG ist sowohl die Hemmung also auch die Steigerung der ACh-Freisetzung durch NO denkbar, da viele Zellen NO-responsiv sind, und fast alle Zellen cholinerg. Die zellphysiologischen Untersuchungen an Zellen des SPG zeigten, dass hinsichtlich der Interaktion zwischen nitrergem und cholinergem System ein Unterschied zwischen MOL2.3-positiven und -negativen Zellen zu verzeichnen ist. Bei den MOL2.3-negativen Zellen bewirkte die Co-Applikation von DEA und ACh eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die derjenigen nach alleiniger Applikation von ACh nahezu entsprach. Bei den MOL2.3-positiven Zellen dagegen verminderte die zusätzliche Applikation von DEA die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung nach cholinergischer Stimulation (Kapitel 3.3.4.1). Eine Desensibilisierung der Zellen durch wiederholte Stimulation mit ACh ist auszuschließen, da die schon beschriebenen Vorversuche dies widerlegen (Kapitel 3.3.2.3). NO scheint hier also die cholinerge Signaltransduktion zu beeinträchtigen. Auch im autonomen, primär sensorischen *Ganglion petrosum* der Katze konnte beobachtet werden, dass NO einen hemmenden Einfluss auf die ACh-Antwort der Zellen hat (Alcayaga et al. 1999). NO vermindert hier die Sensibilität des Rezeptors für ACh und reduziert so die Amplitude und die Frequenz von durch ACh ausgelösten Aktionspotentialen. Nach Entfernung des NO-Donors bzw. Zugabe eines NOS-Blockers war dieser Effekt reversibel (Alcayaga et al. 1999). Die Hemmung der ACh-Antwort MOL2.3-positiver Zellen des SPG durch NO scheint länger anzuhalten als im *Ganglion petrosum*, da auch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Stimulation mit ACh nach einer längeren Ruhephase deutlich erniedrigt war. Ein weiterer möglicher Mechanismus für die Hemmung der cholinergen Transmission durch NO wird weiter unten besprochen. Auch der nNOS-Blocker Vinyl-L-NIO hat einen Effekt auf die Antwort der MOL2.3-positiven Zellen nach cholinergischer Stimulation, der allerdings erst zeitlich verzögert eintrat. Anders als nach den eben beschriebenen Beobachtungen erwartet, hemmt auch der nNOS-Blocker die ACh-Antwort (Kapitel 3.3.4.3). Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es denkbar, dass endogen in MOL2.3-positiven Zellen synthetisiertes NO eine cholinerge Stimulation dieser Zellen triggert, so dass mehr Ca^{2+} ins Zytoplasma gelangt. Da Vinyl-L-NIO sogar in den kultivierten Zellen des SPG eine Reaktion auslösen konnte, ohne dass eine Stimulation der endogenen nNOS vorausging, ist

davon auszugehen, dass auch *in vivo* eine ständige nNOS-Aktivität vorliegt. Eine zusätzliche Stimulation einer solchen Zelle mit NO könnte diesen positiven Effekt hemmen. Über den Mechanismus, wie NO den Ca^{2+} -Einstrom nach cholinergem Stimulation hemmt, konnten in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden werden. In der Literatur wird von einer Hemmung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle des N-Typs corticaler Neuronen durch NO berichtet (Ohkuma et al. 1998). Mit dieser Studie konnte zwar nicht die Existenz von Ca^{2+} -Kanälen des N-Typs im SPG ausgeschlossen werden, wohl aber deren Aktivierung durch ACh. Somit ist ein Antagonismus von NO und ACh an diesen Kanälen auszuschließen.

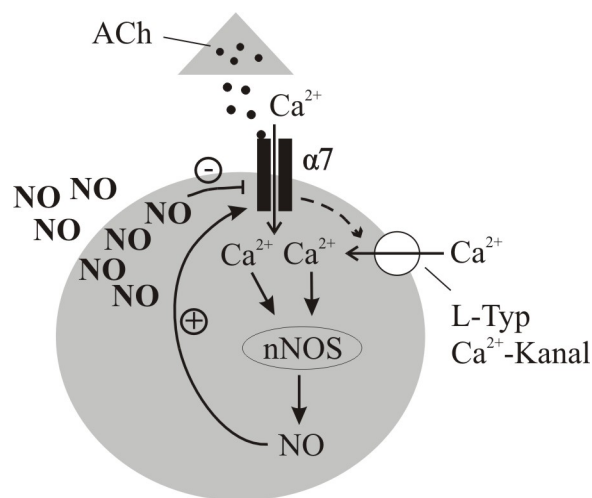


Abbildung 90: Modulation nicotinerger AChR durch NO in MOL2.3-positiven Zellen

Eine basale Aktivität der endogenen nNOS triggert die cholinerge Signaltransduktion in der Zelle. Zusätzliche Stimulation dieser Zelle mit NO einer hohen Konzentration vermindert die Sensibilität des nicotinergeren $\alpha 7$ AChR. (→ fördert, + hemmt)

NO spielt auch bei der Olfaktion eine bedeutende, allerdings noch kaum untersuchte Rolle. Die ersten Untersuchungen, die in Bezug auf die Signaltransduktion im olfaktorischen System gemacht wurden, zeigten, dass hier die 2nd messenger cAMP und IP_3 involviert sind (Breer 2001, Broillet and Firestein 1996a, Hatt 2003). In den letzten Jahren häufen sich Berichte, denen zufolge auch der intrazelluläre Botenstoff cGMP eine Rolle bei der Olfaktion spielt (Breer 1993, Breer et al. 1992, Breer and Shepherd 1993, Juilfs et al. 1997, Meyer et al. 2000, Moon et al. 1998). Dies ist allerdings nicht, wie die Beteiligung von cAMP und IP_3 , in allen OSN der Fall, sondern nur in einzelnen Zellen (Juilfs et al. 1997, Meyer et al. 2000). Starke Stimulation mit Duftstoffen kann in olfaktorischen sensorischen Neuronen eine Antwort der NO/cGMP-Kaskade auslösen, welche molekulare

Mechanismen triggert, unter anderem adaptive Prozesse, die dem olfaktorischen Neuroepithel die Bewältigung starker Stimuli ermöglichen (Breer 1993, Breer et al. 1992, Breer and Shepherd 1993, Redkozubov 2000, Zufall and Leinders-Zufall 1998). NO bzw. cGMP haben hier also unter Umständen eine Schutzfunktion gegen zu starke Stimulation inne. Eine solche Schutzfunktion könnte auch eine Erklärung für die Hemmung der cholinergen Antwort in den MOL2.3-positiven Zellen des SPG durch NO liefern. NO kann in den olfaktorischen sensorischen Neuronen wie in anderen Zellen die Synthese von cGMP induzieren (de Vente et al. 2001, Murad 1999, Southam and Garthwaite 1993). cGMP wiederum vermag es, verschiedene Vorgänge zu beeinflussen. Beispielsweise öffnet cGMP durch zyklische Nukleotide gesteuerte Kationenkanäle. In Neuronen von Mollusken spielt cGMP so eine Rolle bei der Entstehung von Ca^{2+} -Peaks durch Ca^{2+} -Ströme (Paupardin-Tritsch et al. 1986). Dies erklärt auch, warum nach cGMP-Stimulation isolierter olfaktorischer Rezeptoren Ströme gemessen werden konnten, die die gleichen elektrischen Eigenschaften haben wie Ströme nach Odorant-Stimulation. Hier war keine Desensitisierung zu beobachten (Firestein et al. 1991, Zufall et al. 1991). NO kann aber nicht nur indirekt über cGMP fungieren, sondern auch direkt olfaktorische, zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle aktivieren (Broillet and Firestein 1996b, 1997, Leinders-Zufall et al. 1997, Schmachtenberg et al. 2003, Wenisch et al. 2000). Ein weiterer möglicher Mechanismus für die Hemmung der ACh-Antwort durch NO in MOL2.3-positiven Zellen könnte anhand der eben beschriebenen Sachverhalten folgendermaßen aussehen: NO bindet an durch zyklische Nukleotide gesteuerte Kationenkanäle und öffnet diese direkt oder indirekt, indem es die Synthese von cGMP induziert. Über den Kationenkanal strömt Ca^{2+} in die Zelle, was zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration kann die Aktivität nAChR hemmen, wie für das *Ganglion cervicale superior* demonstriert werden konnte (Skok 2002). Die in dieser Arbeit durch hohe Dosen an NO induzierte Suppression der Reaktivität MOL2.3-positiver Zellen auf cholinerge Stimulation könnte *in vivo* durchaus auch aus der Bindung eines adäquaten Liganden an den MOL2.3-Rezeptor resultieren, der daraufhin die NO/cGMP-Kaskade auslösen könnte. Aktivierung des MOL2.3-Rezeptors könnte so die Zellen vor übermäßiger Stimulation mit ACh, unter Umständen auch mit anderen Liganden, schützen.

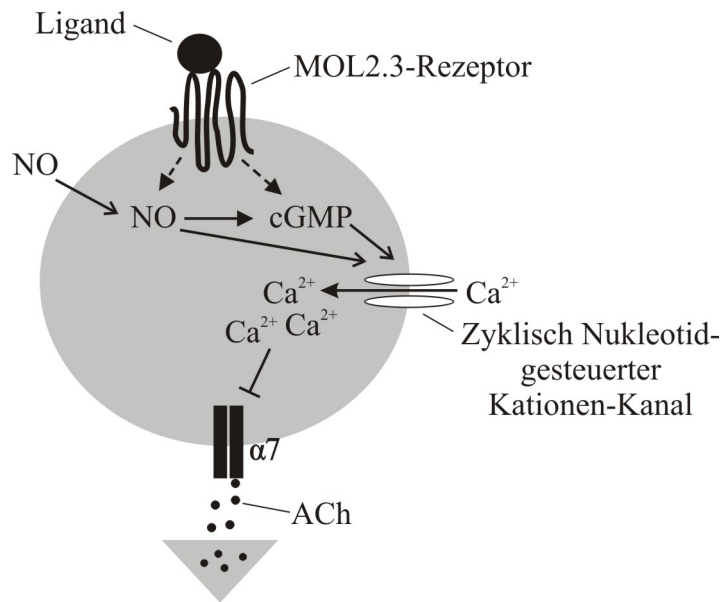


Abbildung 91: Hemmung der cholinergen Signaltransduktion in MOL2.3-positiven Zellen

NO öffnet direkt oder über cGMP Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermindert die Aktivität nAChR.

Stimulation des MOL2.3-Rezeptors mit dem adäquaten Liganden könnte ebenfalls diese NO/cGMP-Kaskade auslösen. (\rightarrow fördert, \dashv hemmt)

Auch eine negative Rückkopplung von cGMP konnte bei der Ratte beobachtet werden, wo Duftstoff-Stimulation cGMP-Bildung bewirkt, welche wiederum über die Bildung von cAMP die cGMP-Synthese negativ reguliert (Moon et al. 1998). Des weiteren scheint cGMP in Entwicklungsprozesse olfaktorischer sensorischer Neuronen involviert zu sein (Ingi and Ronnett 1995, Kafitz et al. 2000).

4.3 Das PACAPerge System und dessen Interaktion mit dem cholinergen System

Für das Vorkommen von PACAP-Rezeptoren im SPG gab es bislang lediglich Hinweise, da beim Menschen mRNA für einen PACAP-Rezeptor detektiert werden konnte (Knutsson and Edvinsson 2002). Mit den Calcium-Imaging Versuchen dieser Arbeit konnten funktionelle PACAP-Rezeptoren in fast der Hälfte aller ganglionären Neurone lokalisiert werden, egal ob diese MOL2.3-positiv oder –negativ waren (Kapitel 3.3.5). Nachdem die Expression des Neuropeptids PACAP im SPG schon für die Katze (Elsas et al. 1996a), die Ratte (Edvinsson et al. 2001, Liu et al. 2000b, Nielsen et al. 1998)) und den Menschen (Uddman et al. 1999) gezeigt werden konnte, gelang dies in der vorliegenden Arbeit auch bei der Maus. Auch PACAP-Immunreaktivität konnte sowohl in MOL2.3-positiven als auch –negativen Zellen detektiert werden (Kapitel 3.1.8). Dieses PACAP könnte PACAP-Rezeptoren an

benachbarten postganglionären Neuronen des SPG stimulieren, oder an den PACAP-exprimierenden Neuronen selbst. Über PACAP in Kerngebieten des Hirnstammes, die dem SPG übergeordnet sind, gibt es in der Literatur keinerlei Hinweise. Der PACAP-Rezeptor ist im SPG mit nAChR co-lokalisiert, so dass eine gegenseitige Beeinflussung dieser verschiedenen Rezeptoren durchaus denkbar ist (Kapitel 3.3.5). PACAP kann über den cAMP-Signalweg die Sensitivität nicotinerger $\alpha 7$ und $\alpha 3$ -spezifischer AChR im *Ganglion ciliare* des Hühnerembryos erhöhen (Margiotta and Pardi 1995). In denselben Zellen kann PACAP aber auch $\alpha 7$ nAChR Adenylatzyklase-unabhängig blockieren (Pardi and Margiotta 1999). Diese Blockade wird nicht über den cAMP-Weg vermittelt, sondern über den Phospholipase C – IP₃-Signalweg, welcher intrazelluläres Ca²⁺ mobilisieren kann (Pardi and Margiotta 1999). In den zellphysiologischen Untersuchungen des SPG zeigte sich, dass Co-Stimulation mit PACAP den Einstrom von Ca²⁺ ins Zytoplasma MOL2.3-positiver und –negativer Zellen als Resultat cholinergischer Stimulation verminderte (Kapitel 3.3.5). Eine Desensibilisierung durch ACh konnte ausgeschlossen werden (Kapitel 3.3.2.3). Das Vorkommen von $\alpha 7$ nAChR in MOL2.3-positiven wie –negativen Zellen des SPG der Maus, sowie deren offensichtliche Co-Lokalisation mit PACAP-Rezeptoren legt nahe, dass auch in diesem Ganglion eine Desensibilisierung der Zellen für ACh durch PACAP stattfindet. Die PACAPergen Neurone des SPG innervieren, ebenso wie die nitrergen Neurone, Blutgefäße des *Circulus arteriosus cerebri* (Edvinsson et al. 2001) und des Auges, sowie die Tränendrüsen (Elsas et al. 1996a). Die Funktion des postganglionären PACAP könnte ebenfalls eine Beeinflussung des cholinergen Systems sein, bzw. über eine Modifikation des cholinergen Systems vermittelt werden. So wurde für unterschiedliche Gewebe eine Beeinflussung der Freisetzung von ACh durch PACAP beschrieben. In der Trachea beispielsweise hemmt PACAP die Freisetzung von ACh aus Nervenendigungen, indem es präsynaptisch die cholinerge Transmission moduliert, was zu einer verminderten Schleimbildung führt (Liu et al. 1999). Ebenfalls in der Trachea blockiert PACAP eine durch elektrische Feldstimulation induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur, ohne aber die Sensitivität für ACh zu vermindern (Shigyo et al. 1998). In den Bronchien aktiviert PACAP die Na⁺/K⁺-ATPase und bewirkt so eine Dilatation von Bronchien, die zuvor durch ACh kontrahiert waren (Kanemura et al. 1993). PACAP inhibiert demzufolge im Atmungssystem sowohl cholinerge als auch nicht-cholinerge Mechanismen (Shigyo et al. 1998). Im Herz dagegen scheint PACAP eher einen stimulierenden Einfluss auf die cholinerge Funktion zu haben indem es die Freisetzung von ACh induziert (Hirose et al. 1997a, Hirose et al. 1997b, Seebeck et al. 1996), ebenso wie an cholinernen Terminalen des Hippocampus (Roberto and Brunelli 2000). Auch im *Plexus myentericus* steigert PACAP Ca²⁺-abhängig die ACh-Freisetzung, welche wiederum eine Kontraktion der glatten

Muskulatur des Ileum bewirkt (Fox-Threlkeld et al. 1999, Katsoulis et al. 1993). Während der Neuromodulator NO, wie oben beschrieben, eine Dilatation der vom SPG innervierten Blutgefäße garantiert, könnte PACAP über die Modulation der ACh-Freisetzung antagonistisch auf den NO-Effekt wirken. Wie oben beschrieben kann die Stimulation nicotinerger $\alpha 7$ Rezeptoren in Hinterwurzelganglien die Synthese von NO induzieren (Haberberger et al. 2003). So könnte PACAP über die Blockade der AChR eine NO-Synthese vermindern. Andererseits wäre es ebenfalls möglich, dass PACAP und NO sich in ihren Wirkungen ergänzen bzw. verstärken, indem NO direkt eine Vasodilatation bewirkt und PACAP indirekt über die Hemmung der ACh-Freisetzung. PACAP vermag aber auch auf direktem Weg eine Verminderung der ACh-induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes auszulösen, welche nicht über AChR vermittelt wird (Mungan et al. 1992). In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass PACAP-27 die Freisetzung von NO auslösen kann (Fox-Threlkeld et al. 1999). Dieses NO wäre im Stande, glatte Muskelzellen des Darms zu dilatieren, ebenso wie es für die glatten Muskelzellen von Blutgefäßwänden beschrieben ist (Goadsby et al. 1996, Kimura et al. 1997, Nozaki et al. 1993). Da nNOS in einem sehr hohen Prozentsatz der ganglionären Zellen lokalisiert ist, und fast die Hälfte aller Zellen auf exogene Stimulation mit PACAP reagieren, ist auch eine solche Interaktion denkbar. Der durch PACAP bewirkte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration könnte die endogene nNOS aktivieren, was wiederum zu einer NO-Produktion führen würde. Fox-Threlkeld et al. (1999) beschreiben zwar, dass nur PACAP-27 eine NO-Freisetzung induzieren kann, nicht aber das in dieser Arbeit eingesetzte PACAP-38, allerdings könnte dies von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sein.

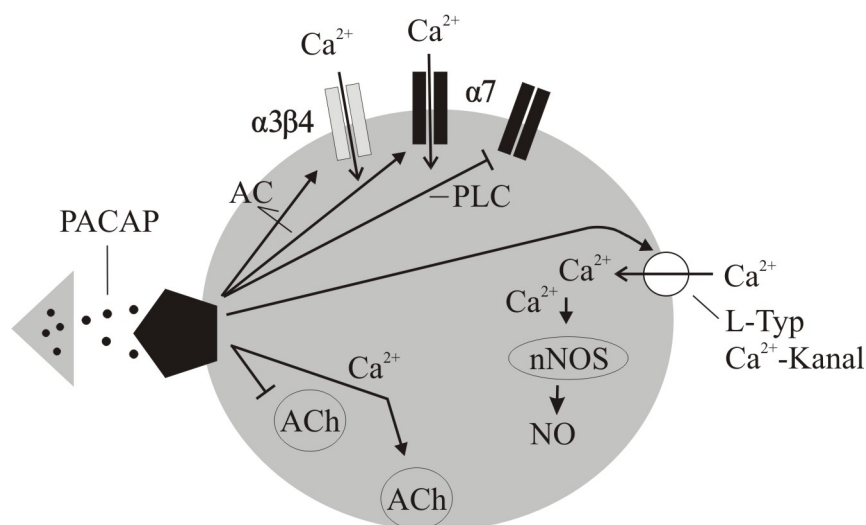


Abbildung 92: Mögliche intrazelluläre Aktionen von PACAP

In MOL2.3-positiven Zellen könnte PACAP die Sensitivität von $\alpha 7$ nAChR AC-abhängig erhöhen oder aber PLC-abhängig hemmen. In MOL2.3-negativen Zellen kann die Sensitivität der nAChR ($\alpha 7$ und $\alpha 3\beta 4$) AC-abhängig gesteigert bzw. PLC-vermittelt ($\alpha 7$) gehemmt werden. Über die Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle kann PACAP die nNOS aktivieren, NO zu synthetisieren. Über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kann die Freisetzung von ACh aus den synaptischen Vesikeln gesteigert werden, oder aber über andere Mechanismen gehemmt.

(AC, Adenylatzyklase; PLC, Phospholipase C)

4.4 Substanz P

Das Vorkommen von Substanz P ist charakteristisch für Neurone, die der Schmerzwahrnehmung dienen. Liu et al. (2000c) gelang der Nachweis von SP in Neuronen des SPG der Ratte, während andere Autoren zwar keine Hinweise für das Vorkommen von SP in neuronalen Somata, aber in Nervenfasern bzw. synaptischen Endigungen finden konnten (Grunditz et al. 1994, Lindberg et al. 1986, Lundblad et al. 1983, Motosugi et al. 1992, Suzuki et al. 1989). Der SP-Rezeptor konnte in vom SPG innervierten Blutgefäßen sowie in Neuronen des SPG nachgewiesen werden (Shimizu et al. 1999). Das Neurotransmitter-Coding dieser Arbeit zeigte, dass SP in MOL2.3-positiven wie –negativen Zellen exprimiert wird (Kapitel 3.1.9). SP könnte demzufolge bei der sensiblen Innervation von weichem Gaumen, Nasenhöhle und Pharynx die Schmerzwahrnehmung vermitteln (Kahle 2001).

4.5 Noradrenalin und Glutamat

Während der klassische Neurotransmitter Noradrenalin im vegetativen Nervensystem normalerweise nicht in parasympathischen Neuronen vorkommt, konnte in einigen parasympathischen, postganglionären Neuronen die Existenz von Noradrenalinrezeptoren nachgewiesen werden (Ishibashi et al. 2003, Skoogh 1986, Skoogh and Svedmyr 1989, Xu and Adams 1993). Keine Berichte gibt es dagegen über die etwaige Expression funktioneller Adrenoceptoren im SPG. Auch in dieser Arbeit konnte keine Reaktivität MOL2.3-positiver Zellen des SPG auf Stimulation mit Noradrenalin hin gezeigt werden (Kapitel 3.3.6).

Kiyama et al. (1993) konnten mittels Immuncytochemie die Existenz von Glutamatrezeptoren im *Ganglion sphenopalatinum* der Ratte nachweisen: In den meisten Hauptneuronen und SIF-Zellen des Ganglions wurden GluR1- und GluR2/3-immunreaktive Zellen identifiziert. GluR4-Immunreaktivität konnte nur in SIF-Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte in der vorliegenden Arbeit keine der untersuchten MOL2.3-positiven Zellen eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf Stimulation mit Glutamat (Kapitel 3.3.7).

4.6 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die Neurone des parasympathischen *Ganglion sphenopalatinum* werden cholinerg innerviert und sind selbst auch cholinerg. Ein großer Teil der cholinergen Neurone exprimiert zusätzlich NO und PACAP, sowie Rezeptoren für diese Neurotransmitter bzw. -modulatoren. Zwischen den drei in dieser Arbeit näher charakterisierten unterschiedlichen Transmittersystemen des SPG existieren ausgeprägte neuronale Interaktionen. Eine gegenseitige Beeinflussung der Systeme wäre aufgrund der in dieser Studie beobachteten Ergebnisse in vielerlei Hinsicht denkbar. So könnte Acetylcholin im Sinne einer Autoregulation seine eigene Freisetzung triggern oder über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Synthese von NO induzieren. Auch eine Verminderung der NO-Freisetzung durch ACh ist nicht auszuschließen. NO selbst wiederum könnte im Gegenzug die ACh-Freisetzung steigern oder hemmen. Außerdem kann NO ebenso wie das Polypeptid PACAP die Sensibilität von nAChR vermindern. PACAP kann nicht nur eine Sensibilitätsverminderung bewirken, sondern – je nach 2nd messenger – auch eine Erhöhung. Zudem wäre eine Beeinflussung der ACh-Freisetzung aus Neuronen durch PACAP ebenso denkbar wie eine Steigerung der NO-Synthese.

Der *orphan* Rezeptor MOL2.3 könnte den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge über die Stimulation eines cGMP-vermittelten Signalwegs in adaptive Prozesse des SPG involviert sein. So wäre eine Hemmung der Aktivität der nAChR durchaus denkbar, was als physiologische Schutzfunktion gegen übermäßige Stimulation interpretiert werden könnte.

Um weitere Hinweise auf die Funktion des MOL2.3-Rezeptors zu erlangen, wäre die Untersuchung eines sympathischen, MOL2.3-exprimierenden Ganglion interessant. Außerdem wäre selbstverständlich die Identifizierung des adäquaten Liganden für den MOL2.3-Rezeptor ein wesentlicher Schritt zu Aufklärung der Funktion.

Zusammenfassung

Olfaktorische Rezeptorproteine (OR) gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wobei einige der transmembranalen OR nicht nur in chemosensorischen, primären Sinneszellen des olfaktorischen Epithels, sondern auch in anderen Geweben nachweisbar sind. So ermöglichte die Co-Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit dem kürzlich identifizierten OR MOL2.3, einem *orphan* Rezeptor mit unbekanntem endogenen bzw. exogenen Liganden, in der transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL die molekularbiologische und fluoreszenzmikroskopische Lokalisation des MOL2.3-Genprodukts zunächst in spezifischen, olfaktorisch sensorischen Neuronen der murinen Riechschleimhaut. GFP-positive Zellen konnten zusätzlich in distinkten Arealen des Hirnstammes (*Area postrema*, *Nucleus tractus solitarius*) sowie in umschriebenen Zellpopulationen cranialer und thorakaler Ganglien des Sympathikus (*Ganglion cervicale craniale*, *Ganglia cervicothoracica*) bzw. Parasympathikus (*Ganglion sphenopalatinum*) demonstriert werden. Zielgewebe, welche efferent von Neuronen des parasympathischen *Ganglion sphenopalatinum* (SPG), inklusive zahlreichen, das MOL2.3-Gen exprimierenden Zellen, innerviert werden, sind die lateralen Nasendrüsen, die Harder'schen Drüsen sowie bestimmte Segmente cranialer Blutgefäße.

Die Transkription eines OR-Gens wie MOL2.3 in ganglionären Einheiten des autonomen Nervensystems wirft nun die Frage nach (1) der möglichen Funktion dieses *orphan* Rezeptors in den exprimierenden Zellen, bzw. (2) möglicherweise unterschiedlichen funktionellen Charakteristika MOL2.3-positiver *versus* MOL2.3-negativer Ganglienzellen der Maus auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst demonstriert werden, dass der MOL2.3-Rezeptor - identifiziert über den co-exprimierten histologischen Marker GFP - in etwa 50 Prozent aller SPG-Neurone der MOL2.3-IGITL Maus exprimiert wird. Der gleichzeitige, fluorometrische Nachweis zweier Antigene ermöglichte die detaillierte, immunhistochemische Analyse der murinen, SPG-intrinsischen und GFP-positiven Neurone und die Erarbeitung ihres zellspezifischen „Neurotransmitter-Coding“. So ergab sich eine signifikante Co-Lokalisation des *orphan* Rezeptors mit den cholinergen Markerproteinen Cholin-Acetyl Transferase (ChAT, >90 %) und vesikulärer Acetylcholin Transporter (VACHT, 90 %), sowie der neuronalen Stickstoffmonoxid Synthase (nNOS, 75 %) als generierendem Enzym des volatilen Botenstoffs Stickstoffmonoxid (NO). Zahlreiche dieser als nitroerg, cholinerg oder cholinerg/nitroerg klassifizierbaren MOL2.3-positiven Neurone erwiesen sich darüber hinaus als cholinerg innerviert, sei es auf klassisch efferente oder retrograd auto- bzw. pararegulatorische Art und Weise. Einige GFP-positive Neurone des SPG neonataler Mäuse co-exprimierten die peptidergen

Neuromodulatoren *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) bzw. Substanz P (SP).

In funktionellen, zellphysiologischen Versuchsansätzen - durchgeführt an Kurzzeit-kultivierten Ganglienzellen des murinen SPG - sollte mittels mikrospektrofluorometrischer Ratio-Imaging Technik (Fura-2) die Bedeutung der immunocytochemisch nachgewiesenen endogenen Neurotransmitter/-modulatoren für die intrazelluläre Signaltransduktion vergleichend in MOL2.3-positiven und -negativen Neuronen ermittelt, und die Daten miteinander verglichen werden. *In vitro* Untersuchungen an MOL2.3-positiven wie -negativen Zellen konnten für beide Zelltypen eine dosisabhängige, wiederholbare und nicht desensibilisierbare Stimulierbarkeit mit Acetylcholin nachweisen, wobei der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) auf dem Einstrom extrazellulären Calciums in die Zelle beruhte. Mit Subtyp-spezifischen, cholinergen Rezeptoragonisten konnten die Acetylcholinrezeptoren (AChR) als überwiegend nicotinerg definiert werden, wobei einzelne Zellen zusätzlich muscarinerge AChR exprimierten. Die nicotinergen AChR der MOL2.3-positiven und -negativen Zellen ließen sich als homomere $\alpha 7$ Rezeptoren klassifizieren, diejenigen der MOL2.3-negativen Zellen zusätzlich als heteromere $\alpha 3\beta 4$ Proteine. Nach cholinenger Stimulation der Zellen strömte extrazelluläres Calcium zum einen durch die genannten nAChR Subtypen ins Zytoplasma, zum Teil auch durch sekundär geöffnete, spannungsabhängige Calciumkanäle des L-Typs, wie mit Co-Stimulationen durch selektive Calciumkanal-Blocker demonstriert werden konnte.

Die repetitive Superfusion der Zellpräparationen mit Acetylcholin bei Ausschluss einer Desensibilisierung der Zellen ermöglichte weiterhin eine detaillierte Charakterisierung der cholinergen Signaltransduktion MOL2.3-positiver und -negativer Zellen im Hinblick auf eine etwaige modulatorische Rolle von NO oder PACAP. Stimulation mit den potenten NO-Donoren DEA und Nor-1 *per se* aktivierten ebenso eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, bestimmt durch den Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Co-Stimulationen der Zellen mit Acetylcholin und DEA zeigten darüber hinaus, dass freigesetztes NO einen transient hemmenden Einfluß auf die cholinerge Aktivierung der MOL2.3-positiven Zellen, nicht aber der MOL2.3-negativen Zellen bewirkte. Diese Beobachtung könnte mit der Expression des MOL2.3-Rezeptors in direktem Zusammenhang stehen. Olfaktorische Rezeptoren können, wie auch NO selbst, cGMP-vermittelt unspezifische Kationenkanäle aktivieren, woraufhin sekundär die Aktivität des nAChR vermindert wird.

Etwa die Hälfte der ganglionären Zellen erwies sich als responsiv für das Neuropeptid PACAP, welches – im Unterschied zu NO - zudem eine Hemmung der Zellantwort auf Acetylcholin in beiden, nicht nur den MOL2.3-positiven Neuronentypen induzierte. Diese Hemmung dürfte auf einer Desensibilisierung der

$\alpha 7$ nAChR durch PACAP beruhen. Das Neuropeptid PACAP könnte im Rahmen der Zell-spezifischen Funktionen des SPG z.B. die Sensitivität nicotinerger AChR, die Freisetzung von Acetylcholin, oder mittels Aktivierung von Calciumkanälen des L-Typs die NO-Synthese modulieren. Die ganglionären Neuronen zeigten sich als nicht-responsiv für Noradrenalin und Glutamat.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass zwischen den hier charakterisierten Transmittersystemen des *Ganglion sphenopalatinum* der neonatalen Maus komplexe hemmende wie auch aktivierende Interaktionen möglich sind. Der MOL2.3-Rezeptor könnte demzufolge im *Ganglion sphenopalatinum* eine essentielle Rolle bei adaptiven neuronalen Prozessen spielen und die Zellen so vor Stimulation mit zu starken Stimuli schützen.

Summary

Olfactory receptor proteins belong to the superfamily of G-protein coupled receptors. Certain members of the transmembranal olfactory receptor group appear to be expressed not only in chemosensory neurons of the olfactory epithelium but also in other tissues. In the transgenic mouse line MOL2.3-IGITL, a recently identified olfactory receptor gene encoding an orphan receptor with yet unknown endo- or exogenous ligand is co-expressed with green-fluorescent protein (GFP). Employing expression of GFP as histologically identifiable marker protein, the MOL2.3 gene product can be detected in olfactory sensory neurons of the mouse nasal epithelium. GFP-positive cells can additionally be localized in distinct areas of the brainstem (area postrema, nucleus tractus solitarius) and cell populations within certain sympathetic (cervical cranial and cervicothoracic ganglia) and parasympathetic (sphenopalatine ganglion) cranial and thoracic ganglia. Target tissues innervated by sphenopalatine ganglionic cells in general are the lateral nasal glands, the Harderian glands and distinct sections of cranial blood vessels. All these tissues receive input from MOL2.3 gene expressing sphenopalatine ganglionic cells.

Transcription of an olfactory receptor gene like MOL2.3 in neurons of the autonomic nervous system raises the interesting question about (1) a putative functional role of the encoded orphan receptor protein in these cells and (2) different functional characteristics of MOL2.3-positive *versus* –negative ganglionic cells.

Within the autonomic sphenopalatine ganglion of newborn mice, some 50 % of all ganglionic cells express the orphan olfactory receptor MOL2.3, detectable via GFP-positive immunofluorescence. Neurochemical transmitter coding reveals distinct patterns of MOL2.3 co-localization preferentially with choline acetyl transferase (ChAT >90 %), vesicular acetylcholine transporter (VACHT 90 %) as well as neuronal nitric oxide synthase (nNOS 75 %). High numbers of these nitrenergic, cholinergic or cholinergic/nitrenergic MOL2.3-positive neurons receive innervation from cholinergic cells, whether of classical efferent or auto- e.g. pararegulatory origin. A few MOL2.3 positive neurons also express pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and substance P (SP).

In functional, cell physiological approaches, using the ratio imaging method (fura-2), the role of the immunohistochemically detected endogenous neurotransmitters/-modulators for intracellular signal transduction should be defined and compared between MOL2.3-positive and –negative cells. *In vitro* signal transduction studies of MOL2.3-positive as well as –negative cells revealed dose-dependent, repetitive and non-desensitizing rises in intracellular calcium concentration due to stimulation with acetylcholine (ACh). The rise in intracellular calcium was based on extracellular calcium influx. The ACh receptors (AChR) in the

sphenopalatine ganglionic cells predominantly belonged to the nicotinic subtype whereas some cells additionally expressed muscarinic receptors. The nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) of the MOL2.3-positive cells proved to be of the $\alpha 7$ subtype; in MOL2.3-negative cells the subunit-compositions $\alpha 3\beta 4$ as well as $\alpha 7$ were expressed. Co-stimulation experiments with selective calcium channel blockers demonstrated, that after cholinergic stimulation calcium entered the cytosol through nAChR as well as secondary opened L-type calcium channels.

Repetitive superfusion of the cell preparation with acetylcholine at 10^{-4} M/l excluded desensitisation phenomena and allowed detailed characterization the cholinergic signal transduction in MOL2.3 positive and -negative cells with regard to the putative modulatory role of NO or PACAP. Stimulation with the potent nitrenergic substances DEA and Nor-1 also activated an intracellular signal transduction cascade, which finally resulted in an increase in intracellular calcium. Co-application of ACh and DEA led to significantly reduced elevations in intracellular calcium as compared to cholinergic stimulation without NO in MOL2.3-positive but not -negative cells. These observations could be linked to the expression of the MOL2.3-receptor. Olfactory receptors are, as NO *per se*, able to activate cyclic nucleotide gated cation channels in a cGMP-dependent manner, followed by decreased activity of nAChR.

About half of the ganglionic cells proved responsive to stimulation with the neuropeptide PACAP. PACAP caused an inhibition of the cholinergically induced cellular responses, which was seen not only in MOL2.3-positive but also -negative cells. This inhibition could be the result of a desensitisation of $\alpha 7$ nAChR by PACAP. However, PACAP might be involved in various cellular functions. For example it could in- or decrease the nAChR-sensitivity or the liberation of ACh. Via activation of L-type calcium-channels PACAP could further induce or increase NO-synthesis. The ganglionic neurons did not respond to norepinephrine or glutamate.

Summarizing the results of this study there are different, inhibitory as well as activating interactions between the different transmitter-systems in the murine sphenopalatine ganglion. The MOL2.3-receptor might play an essential role in adaptive neuronal processes to protect the cells against strong stimuli.

Literaturverzeichnis

- Adams, D. J., and T. J. Nutter. 1992.** Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol Paris* 86: 67-76.
- Akasu, T., and T. Nishimura. 1995.** Synaptic transmission and function of parasympathetic ganglia. *Prog Neurobiol* 45: 459-522.
- Alberts, B., and A. Johnson. 2001.** *Molecular Biology of the Cell.* Taylor & Francis Inc.
- Alcayaga, J., M. Barrios, F. Bustos, G. Miranda, M. J. Molina, and R. Iturriaga. 1999.** Modulatory effect of nitric oxide on acetylcholine-induced activation of cat petrosal ganglion neurons in vitro. *Brain Res* 825: 194-198.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles. 2001.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.
- Anand, R., X. Peng, J. J. Ballesta, and J. Lindstrom. 1993.** Pharmacological characterization of alpha-bungarotoxin-sensitive acetylcholine receptors immunisolated from chick retina: contrasting properties of alpha 7 and alpha 8 subunit-containing subtypes. *Mol Pharmacol* 44: 1046-1050.
- Anderson, C. R., R. M. McAllen, and S. L. Edwards. 1995.** Nitric oxide synthase and chemical coding in cat sympathetic postganglionic neurons. *Neuroscience* 68: 255-264.
- Arancio, O., M. Kiebler, C. J. Lee, V. Lev-Ram, R. Y. Tsien, E. R. Kandel, and R. D. Hawkins. 1996.** Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87: 1025-1035.
- Arvidsson, U., M. Riedl, R. Elde, and B. Meister. 1997.** Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378: 454-467.
- Ayajiki, K., T. Tanaka, T. Okamura, and N. Toda. 2000.** Evidence for nitroxidergic innervation in monkey ophthalmic arteries in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2006-2012.
- Babu, B. R., and O. W. Griffith. 1998.** N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 273: 8882-8889.
- Baldwin, J. M. 1993.** The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *Embo J* 12: 1693-1703.
- Baylor, S. M., and S. Hollingworth. 2000.** Measurement and Interpretation of Cytoplasmic. *News Physiol Sci* 15: 19-26.

- Bennett, M. R. 1997.** Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on. *Prog Neurobiol* 52: 159-195.
- Bennett, M. R. 2000.** The concept of transmitter receptors: 100 years on. *Neuropharmacology* 39: 523-546.
- Berthold, M., M. Collin, T. Sejlitz, B. Meister, and P. Lind. 2003.** Cloning of a novel orphan G protein-coupled receptor (GPCR-2037): in situ hybridization reveals high mRNA expression in rat brain restricted to neurons of the habenular complex. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 22-29.
- Blache, P., L. Gros, G. Salazar, and D. Bataille. 1998.** Cloning and tissue distribution of a new rat olfactory receptor-like (OL2). *Biochem Biophys Res Commun* 242: 669-672.
- Blute, T. A., C. Strang, K. T. Keyser, and W. D. Eldred. 2003.** Activation of the cGMP/nitric oxide signal transduction system by nicotine in the retina. *Vis Neurosci* 20: 165-176.
- Boeckxstaens, G. E., J. G. De Man, P. A. Pelckmans, K. M. Cromheeke, A. G. Herman, and Y. M. Van Maercke. 1993.** Ca²⁺ dependency of the release of nitric oxide from non-adrenergic non-cholinergic nerves. *Br J Pharmacol* 110: 1329-1334.
- Bredt, D. S. 1999.** Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31: 577-596.
- Bredt, D. S., and S. H. Snyder. 1990.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 682-685.
- Bredt, D. S., P. M. Hwang, and S. H. Snyder. 1990.** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770.
- Breer, H. 1993.** Second messenger signalling in olfaction. *Ciba Found Symp* 179: 97-109; discussion 109-114, 147-109.
- Breer, H. 2001.** Intrduction: molecular mechanism of olfaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 501-501.
- Breer, H., and G. M. Shepherd. 1993.** Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci* 16: 5-9.
- Breer, H., T. Klemm, and I. Boekhoff. 1992.** Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuroreport* 3: 1030-1032.
- Breer, H., I. Wanner, and J. Strotmann. 1996.** Molecular genetics of mammalian olfaction. *Behav Genet* 26: 209-219.
- Bretscher, L. E., H. Li, T. L. Poulos, and O. W. Griffith. 2003.** Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N5-(iminoalkyl)- and N5-(iminoalkenyl)-ornithines. *J Biol Chem* 278: 46789-46797.

- Broillet, M. C., and S. Firestein. 1996a.** Gaseous second messengers in vertebrate olfaction. *J Neurobiol* 30: 49-57.
- Broillet, M. C., and S. Firestein. 1996b.** Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* 16: 377-385.
- Broillet, M. C., and S. Firestein. 1997.** Beta subunits of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel form a nitric oxide activated Ca²⁺ channel. *Neuron* 18: 951-958.
- Broillet, M. C., and S. Firestein. 1999.** Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation. *Ann N Y Acad Sci* 868: 730-740.
- Buck, L., and R. Axel. 1991.** A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
- Bult, H., G. E. Boeckxstaens, P. A. Pelckmans, F. H. Jordaens, Y. M. Van Maercke, and A. G. Herman. 1990.** Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346-347.
- Callahan, C. A., and J. B. Thomas. 1994.** Tau-beta-galactosidase, an axon-targeted fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5972-5976.
- Ceccatelli, S., J. M. Lundberg, X. Zhang, K. Aman, and T. Hokfelt. 1994.** Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system. *Brain Res* 656: 381-395.
- Chad, J. E., I. Stanford, H. V. Wheal, R. Williamson, and G. Woodhall. 1991.** Dissociated neurons from the adult rat hippocampus, pp. 19-38. *In* P. H. Cobbold [ed.], *Cellular Neurobiology, A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Chatterjee, T. K., R. V. Sharma, and R. A. Fisher. 1996.** Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 271: 32226-32232.
- Christopoulos, A., and T. Kenakin. 2002.** G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54: 323-374.
- Colquhoun, L. M., and J. W. Patrick. 1997.** Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol* 39: 191-220.
- Contreras, R. J., M. M. Gomez, and R. Norgren. 1980.** Central origins of cranial nerve parasympathetic neurons in the rat. *J Comp Neurol* 190: 373-394.
- Conzelmann, S., O. Levai, B. Bode, U. Eisel, K. Raming, H. Breer, and J. Strotmann. 2000.** A novel brain receptor is expressed in a distinct population of olfactory sensory neurons. *Eur J Neurosci* 12: 3926-3934.
- Coons, A. H. 1958.** Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1: 399-422.

- Coronas, V., M. Durand, J. G. Chabot, F. Jourdan, and R. Quirion. 2000.** Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures. *Neuroscience* 98: 213-219.
- Cox, D. H., and K. Dunlap. 1994.** Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J Gen Physiol* 104: 311-336.
- Cruz, H. J., E. M. Dias, J. L. Moreira, and M. J. Carrondo. 1997.** Cell-dislodging methods under serum-free conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 482-488.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y. Tsien. 1995.** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20: 448-455.
- Cuthbertson, S., B. Jackson, C. Toledo, M. E. Fitzgerald, Y. F. Shih, Y. Zagvazdin, and A. Reiner. 1997.** Innervation of orbital and choroidal blood vessels by the pterygopalatine ganglion in pigeons. *J Comp Neurol* 386: 422-442.
- D'Agostino, G., M. L. Bolognesi, A. Lucchelli, D. Vicini, B. Balestra, V. Spelta, C. Melchiorre, and M. Tonini. 2000.** Prejunctional muscarinic inhibitory control of acetylcholine release in the human isolated detrusor: involvement of the M4 receptor subtype. *Br J Pharmacol* 129: 493-500.
- Dauphin, F., J. W. Richard, J. Seylaz, R. Quirion, and E. Hamel. 1991.** Acetylcholine levels and choline acetyltransferase activity in rat cerebrovascular bed after uni- or bilateral sphenopalatine ganglionectomy. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 253-260.
- Dawson, T. M., V. L. Dawson, and S. H. Snyder. 1992.** A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32: 297-311.
- Dawson, T. M., D. S. Bredt, M. Fotuhi, P. M. Hwang, and S. H. Snyder. 1991.** Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7797-7801.
- Day, I. N. 1988.** Molecular analysis of two general markers of neurons and the diffuse neuroendocrine system: neuron-specific enolase and PGP9.5. *Biochem Soc Trans* 16: 454-457.
- Day, I. N. 1992.** Enolases and PGP9.5 as tissue-specific markers. *Biochem Soc Trans* 20: 637-642.
- Day, M. 1999.** Sphenopalatine Ganglion Analgesia. *Curr Rev Pain* 3: 342-347.
- de Vente, J., M. Markerink-van Ittersum, H. Axer, and H. W. Steinbusch. 2001.** Nitric-oxide-induced cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat brain. *Exp Brain Res* 136: 480-491.

- Dreyer, W. J. 1998.** The area code hypothesis revisited: olfactory receptors and other related transmembrane receptors may function as the last digits in a cell surface code for assembling embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9072-9077.
- Dröbler, K., and D. Gerns. 2000.** Wörterbuch der Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer.
- Drubin, D. G., and M. W. Kirschner. 1986.** Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103: 2739-2746.
- Drutel, G., J. M. Arrang, J. Diaz, C. Wisniewsky, K. Schwartz, and J. C. Schwartz. 1995.** Cloning of OL1, a putative olfactory receptor and its expression in the developing rat heart. *Receptors Channels* 3: 33-40.
- Dun, E. C., R. L. Huang, S. L. Dun, and N. J. Dun. 1996.** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res* 721: 233-237.
- Edvinsson, L., H. Hara, and R. Uddman. 1989.** Retrograde tracing of nerve fibers to the rat middle cerebral artery with true blue: colocalization with different peptides. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 212-218.
- Edvinsson, L., T. Elsas, N. Suzuki, T. Shimizu, and T. J. Lee. 2001.** Origin and Co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat. *Microsc Res Tech* 53: 221-228.
- Elsas, T., R. Uddman, and F. Sundler. 1996a.** Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-immunoreactive nerve fibers in the cat eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 573-580.
- Elsas, T., R. Uddman, and F. Sundler. 1996b.** Vasoactive intestinal peptide- and nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat ophthalmic artery have different origins. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 125-130.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien, and W. A. Catterall. 2000.** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: 533-535.
- Evans, C. H., M. Stefanovic-Racic, and J. Lancaster. 1995.** Nitric oxide and its role in orthopaedic disease. *Clin Orthop*: 275-294.
- Feil, R., N. Gappa, M. Rutz, J. Schlossmann, C. R. Rose, A. Konnerth, S. Brummer, S. Kuhbandner, and F. Hofmann. 2002.** Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res* 90: 1080-1086.
- Feingold, E. A., L. A. Penny, A. W. Nienhuis, and B. G. Forget. 1999.** An olfactory receptor gene is located in the extended human beta-globin gene cluster and is expressed in erythroid cells. *Genomics* 61: 15-23.

- Ferrero, R., F. Rodriguez-Pascual, M. T. Miras-Portugal, and M. Torres. 1999.** Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 127: 779-787.
- Firestein, S., B. Darrow, and G. M. Shepherd. 1991.** Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron* 6: 825-835.
- Forth, W., D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann, and K. Starke. 2001.** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag München.
- Fox-Threlkeld, J. A., T. J. McDonald, Z. Woskowska, K. Iesaki, and E. E. Daniel. 1999.** Pituitary adenylate cyclase-activating peptide as a neurotransmitter in the canine ileal circular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 66-75.
- Frangakis, M. V., and H. K. Kimelberg. 1984.** Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 9: 1689-1698.
- Frangakis, M. V., W. J. Koopman, H. Kiyono, S. M. Michalek, and J. R. McGhee. 1982.** An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immunol Methods* 48: 33-44.
- Freitag, J., J. Krieger, J. Strotmann, and H. Breer. 1995.** Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15: 1383-1392.
- Freitag, J., G. Ludwig, I. Andreini, P. Rossler, and H. Breer. 1998.** Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J Comp Physiol [A]* 183: 635-650.
- Freshney, R. I. 1990.** Tierische Zellkulturen - Ein Methoden-Handbuch. de Gruyter, Berlin.
- Frey, H.-H., and W. Löscher. 1996.** Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.
- Fu, W. M., H. C. Liou, and Y. H. Chen. 1998.** Nerve terminal currents induced by autoreception of acetylcholine release. *J Neurosci* 18: 9954-9961.
- Ganong, W. F. 2000.** Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 422-427.
- Garcia, L., J. Audin, G. D'Alessandro, B. Bioulac, and C. Hammond. 2003.** Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci* 23: 8743-8751.
- Garthwaite, J., and C. L. Boulton. 1995.** Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57: 683-706.

- Gebke, E., A. R. Muller, M. Jurzak, and R. Gerstberger. 1998.** Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85: 509-520.
- Gebke, E., A. R. Muller, U. Pehl, and R. Gerstberger. 2000.** Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience* 97: 371-381.
- Gerstberger, R. 1999.** Nitric Oxide and Body Temperature Control. *News Physiol Sci* 14: 30-36.
- Gibbins, I. L., and J. L. Morris. 1987.** Co-existence of neuropeptides in sympathetic, cranial autonomic and sensory neurons innervating the iris of the guinea-pig. *J Auton Nerv Syst* 21: 67-82.
- Gilmor, M. L., N. R. Nash, A. Roghani, R. H. Edwards, H. Yi, S. M. Hersch, and A. I. Levey. 1996.** Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci* 16: 2179-2190.
- Girod, R., N. Barazangi, D. McGehee, and L. W. Role. 2000.** Facilitation of glutamatergic neurotransmission by presynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 39: 2715-2725.
- Goadsby, P. J., R. Uddman, and L. Edvinsson. 1996.** Cerebral vasodilatation in the cat involves nitric oxide from parasympathetic nerves. *Brain Res* 707: 110-118.
- Gonzalez-Hernandez, T., and A. Rustioni. 1999.** Nitric oxide synthase and growth-associated protein are coexpressed in primary sensory neurons after peripheral injury. *J Comp Neurol* 404: 64-74.
- Gray, D. B., L. Polo-Parada, G. R. Pilar, P. Eang, R. R. Metzger, E. Klann, and S. D. Meriney. 1999.** A nitric oxide/cyclic GMP-dependent protein kinase pathway alters transmitter release and inhibition by somatostatin at a site downstream of calcium entry. *J Neurochem* 72: 1981-1990.
- Gray, R., A. S. Rajan, K. A. Radcliffe, M. Yakehiro, and J. A. Dani. 1996.** Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383: 713-716.
- Grunditz, T., R. Uddman, and F. Sundler. 1994.** Origin and peptide content of nerve fibers in the nasal mucosa of rats. *Anat Embryol (Berl)* 189: 327-337.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. 1985.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- Gurrath, M. 2001.** Peptide-binding G protein-coupled receptors: new opportunities for drug design. *Curr Med Chem* 8: 1605-1648.
- Haberberger, R. V., M. Henrich, K. S. Lips, and W. Kummer. 2003.** Nicotinic receptor $\alpha 7$ -subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide

- synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol* 120: 173-181.
- Hanazawa, T., K. Tanaka, T. Chiba, and A. Konno. 1997.** Distribution and origin of nitric oxide synthase-containing nerve fibers in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 117: 735-737.
- Hanazawa, T., H. Motosugi, A. Konno, T. Kaneko, K. Tanaka, and T. Chiba. 1993.** Distribution of NADPH-diaphorase positive nerve fibers in the rat nasal mucosa. *Neurosci Lett* 159: 71-74.
- Hanazawa, T., A. Konno, T. Kaneko, K. Tanaka, H. Ohshima, H. Esumi, and T. Chiba. 1994.** Nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in the nasal mucosa of the rat. *Brain Res* 657: 7-13.
- Hara, H., G. S. Hamill, and D. M. Jacobowitz. 1985.** Origin of cholinergic nerves to the rat major cerebral arteries: coexistence with vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res Bull* 14: 179-188.
- Hara, H., Q. J. Zhang, T. Kuroyanagi, and S. Kobayashi. 1993.** Parasympathetic cerebrovascular innervation: an anterograde tracing from the sphenopalatine ganglion in the rat. *Neurosurgery* 32: 822-827; discussion 827.
- Hardebo, J. E., N. Suzuki, E. Ekblad, and C. Owman. 1992.** Vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine coexist with neuropeptide Y, dopamine-beta-hydroxylase, tyrosine hydroxylase, substance P or calcitonin gene-related peptide in neuronal subpopulations in cranial parasympathetic ganglia of rat. *Cell Tissue Res* 267: 291-300.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988.** Antibodies - A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Harre, E. M., J. Roth, R. Gerstberger, and T. Hubschle. 2003.** Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* 980: 151-155.
- Hatt, H. 1995.** Geschmack & Geruch, pp. 316-327. *In* G. Thews [ed.], *Physiologie des Menschen*, 26. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hatt, H. 2003.** Riechen und Schmecken, pp. 301-316. *In* Unsicker [ed.], *Lehrbuch Vorklinik*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Heiss, L. N., J. R. Lancaster, Jr., J. A. Corbett, and W. E. Goldman. 1994.** Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 267-270.
- Herring, N., S. Golding, and D. J. Paterson. 2000.** Pre-synaptic NO-cGMP pathway modulates vagal control of heart rate in isolated adult guinea pig atria. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1795-1804.
- Hinman, L. E., and P. J. Sammak. 1998.** Intensity modulation of pseudocolor images. *Biotechniques* 25: 124-128.

- Hirata, H., A. Albillos, F. Fernandez, J. Medrano, A. Jurkiewicz, and A. G. Garcia. 1997.** omega-Conotoxins block neurotransmission in the rat vas deferens by binding to different presynaptic sites on the N-type Ca²⁺ channel. *Eur J Pharmacol* 321: 217-223.
- Hirose, M., Y. Furukawa, Y. Nagashima, M. Lakhe, and S. Chiba. 1997a.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-27 causes a biphasic chronotropic effect and atrial fibrillation in autonomically decentralized, anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 478-487.
- Hirose, M., Y. Furukawa, Y. Nagashima, M. Lakhe, Y. Miyashita, and S. Chiba. 1997b.** PACAP-27 causes negative and positive dromotropic effects in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 338: 35-42.
- Hollmann, M., A. O'Shea-Greenfield, S. W. Rogers, and S. Heinemann. 1989.** Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342: 643-648.
- Hood, L., H. V. Huang, and W. J. Dreyer. 1977.** The area-code hypothesis: the immune system provides clues to understanding the genetic and molecular basis of cell recognition during development. *J Supramol Struct* 7: 531-559.
- Horn, T. F., G. Wolf, S. Duffy, S. Weiss, G. Keilhoff, and B. A. MacVicar. 2002.** Nitric oxide promotes intracellular calcium release from mitochondria in striatal neurons. *Faseb J* 16: 1611-1622.
- Hoshino, T., K. Yoshizaki, H. Koyano, K. Ishikawa, N. Terada, and A. Konno. 1998.** An electrophysiological study of pterygopalatine ganglion neurons in the rabbit. *Acta Otolaryngol Suppl* 537: 20-26.
- Howard, A. D., G. McAllister, S. D. Feighner, Q. Liu, R. P. Nargund, L. H. Van der Ploeg, and A. A. Patchett. 2001.** Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* 22: 132-140.
- Inagaki, N., H. Yoshida, M. Mizuta, N. Mizuno, Y. Fujii, T. Gono, J. Miyazaki, and S. Seino. 1994.** Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2679-2683.
- Ingi, T., and G. V. Ronnett. 1995.** Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 15: 8214-8222.
- Ishibashi, H., M. Umezu, I. S. Jang, Y. Ito, and N. Akaike. 2003.** Alpha 1-adrenoceptor-activated cation currents in neurones acutely isolated from rat cardiac parasympathetic ganglia. *J Physiol* 548: 111-120.
- Ishihara, T., R. Shigemoto, K. Mori, K. Takahashi, and S. Nagata. 1992.** Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8: 811-819.
- Jaag, H. M., L. Kawchuk, W. Rohde, R. Fischer, N. Emans, and D. Pruffer. 2003.** An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs

expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8939-8944.

Janeway, C. A., and P. Travers. 1997. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and J. D. Capra. 1999. Immunobiology. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing.

Jänig, W. 2000. Vegetatives Nervensystem. *In* H.-G. Schaible [ed.], Neuro- und Sinnesphysiologie. Springer Verlag, Berlin.

Jeon, S. Y., J. Kim, and E. G. Hwang. 1997. Origin and distribution of NADPH diaphorase-positive nerves in rat nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106: 688-692.

Juilfs, D. M., H. J. Fulle, A. Z. Zhao, M. D. Houslay, D. L. Garbers, and J. A. Beavo. 1997. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3388-3395.

Jurzak, M., A. R. Muller, and R. Gerstberger. 1995a. Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs. *Neuroscience* 65: 1145-1159.

Jurzak, M., A. R. Muller, and R. Gerstberger. 1995b. AVP-fragment peptides induce Ca²⁺ transients in cells cultured from rat circumventricular organs. *Brain Res* 673: 349-355.

Jurzak, M., A. R. Muller, H. A. Schmid, and R. Gerstberger. 1994. Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res* 662: 198-208.

Kafitz, K. W., T. Leinders-Zufall, F. Zufall, and C. A. Greer. 2000. Cyclic GMP evoked calcium transients in olfactory receptor cell growth cones. *Neuroreport* 11: 677-681.

Kahle, W. 2001. Taschenatlas der Anatomie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kanemura, T., J. Tamaoki, A. Chiyotani, K. Takeyama, N. Sakai, E. Tagaya, and K. Konno. 1993. Role of Na(+)-K(+)-ATPase in airway smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 79: 11-22.

Kaplan, S. S., J. R. Lancaster, Jr., R. E. Basford, and R. L. Simmons. 1996. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect Immun* 64: 69-76.

Katsoulis, S., A. Clemens, H. Schworer, W. Creutzfeldt, and W. E. Schmidt. 1993. PACAP is a stimulator of neurogenic contraction in guinea pig ileum. *Am J Physiol* 265: G295-302.

- Kimura, T., J. G. Yu, L. Edvinsson, and T. J. Lee. 1997.** Cholinergic, nitric oxidergic innervation in cerebral arteries of the cat. *Brain Res* 773: 117-124.
- Kitaichi, K., J. C. Day, and R. Quirion. 1999.** A novel muscarinic M(4) receptor antagonist provides further evidence of an autoreceptor role for the muscarinic M(2) receptor sub-type. *Eur J Pharmacol* 383: 53-56.
- Kiyama, H., K. Sato, T. Kuba, and M. Tohyama. 1993.** Sympathetic and parasympathetic ganglia express non-NMDA type glutamate receptors: distinct receptor subunit composition in the principle and SIF cells. *Brain Res Mol Brain Res* 19: 345-348.
- Klimaschewski, L. 2003.** Autonomes Nervensystem, pp. 103-124. *In* Unsicker [ed.], *Lehrbuch Vorklinik*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Klinke, R., and S. Silbernagel. 2003.** *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. Palmer, and S. Moncada. 1989.** Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5159-5162.
- Knutsson, M., and L. Edvinsson. 2002.** Distribution of mRNA for VIP and PACAP receptors in human cerebral arteries and cranial ganglia. *Neuroreport* 13: 507-509.
- Koch, T., and R. Berg. 1993.** *Lehrbuch der Veterinär-Anatomie - Die großen Versorgungs- und Steuerungssysteme*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Kochegarov, A. A. 2003.** Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium* 33: 145-162.
- Kondo, T., T. Inokuchi, K. Ohta, H. Annoh, and J. Chang. 2000.** Distribution, chemical coding and origin of nitric oxide synthase-containing nerve fibres in the guinea pig nasal mucosa. *J Auton Nerv Syst* 80: 71-79.
- Kotecha, N., and F. P. Coffa. 1999.** NO mediates postjunctional inhibitory effect of neurogenic ACh in guinea pig small intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 277: H1441-1446.
- Krukoff, T. L. 1999.** Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 52-65.
- Kulak, J. M., J. M. McIntosh, D. Yoshikami, and B. M. Olivera. 2001.** Nicotine-evoked transmitter release from synaptosomes: functional association of specific presynaptic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels. *J Neurochem* 77: 1581-1589.
- Lacroix, J. S., E. K. Potter, and E. McLachlan. 1998.** Nitric oxide and parasympathetic vascular and secretory control of the dog nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 118: 257-263.

- Lancaster, F. E. 1995.** Alcohol and the brain: what's NO got to do with it? *Metab Brain Dis* 10: 125-133.
- Lancaster, J. R., Jr. 1994.** Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8137-8141.
- Lancaster, J. R., Jr. 1997.** A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1: 18-30.
- Lancet, D. 1986.** Vertebrate olfactory reception. *Annu Rev Neurosci* 9: 329-355.
- Lancet, D., N. Ben-Arie, S. Cohen, U. Gat, R. Gross-Isseroff, S. Horn-Saban, M. Khen, H. Lehrach, M. Natochin, M. North, and et al. 1993.** Olfactory receptors: transduction, diversity, human psychophysics and genome analysis. *Ciba Found Symp* 179: 131-141; discussion 141-136.
- Larsen, P. J. 1999.** Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* 46: 296-304.
- Leblanc, G. G., and S. C. Landis. 1989.** Differentiation of noradrenergic traits in the principal neurons and small intensely fluorescent cells of the parasympathetic sphenopalatine ganglion of the rat. *Dev Biol* 131: 44-59.
- Lee, A. M., D. B. Jacoby, and A. D. Fryer. 2001.** Selective muscarinic receptor antagonists for airway diseases. *Curr Opin Pharmacol* 1: 223-229.
- Lee, S. H., T. Iwanaga, and T. Fujita. 1995a.** Intraepithelial nerve fibers in the nasal mucosa of the rat with special reference to the localization of CGRP, VIP and nitric oxide (NO). *Arch Histol Cytol* 58: 449-456.
- Lee, S. H., T. Iwanaga, O. Hoshi, I. Adachi, and T. Fujita. 1995b.** Nitric oxide synthase in rat nasal mucosa; immunohistochemical and histochemical localization. *Acta Otolaryngol* 115: 823-829.
- Leinders-Zufall, T., M. N. Rand, G. M. Shepherd, C. A. Greer, and F. Zufall. 1997.** Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J Neurosci* 17: 4136-4148.
- Li, X., E. V. Varga, D. Stropova, T. Zalewska, E. Malatynska, R. J. Knapp, W. R. Roeske, and H. I. Yamamura. 1996.** delta-Opioid receptor: the third extracellular loop determines naltrindole selectivity. *Eur J Pharmacol* 300: R1-2.
- Liddell, E., and I. Weeks. 1996.** Immunlokalisation. *In* I. Weeks [ed.], *Antikörper-Techniken*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Lin, A. Y., J. Szmydynger-Chodobska, M. P. Rahman, B. Mayer, P. R. Monfils, C. E. Johanson, Y. P. Lim, S. Corsetti, and A. Chodobski. 1996.** Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in rat anterior choroidal artery, stromal blood microvessels, and choroid plexus epithelial cells. *Cell Tissue Res* 285: 411-418.

- Lindberg, S., U. Mercke, and R. Uddman. 1986.** The morphological basis for the effect of substance P on mucociliary activity in rabbit maxillary sinus. *Acta Otolaryngol* 101: 314-319.
- Liu, C., T. Shirasaki, S. Tanaka, and K. Kuba. 2000a.** Activity-dependent enhancement of miniature excitatory postsynaptic current amplitude and its modulation by protein kinase C in cultured rat sympathetic neurons. *Neurosci Lett* 280: 57-60.
- Liu, D. M., J. Cuevas, and D. J. Adams. 2000b.** VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. *Eur J Neurosci* 12: 2243-2251.
- Liu, J., M. S. Evans, and T. J. Lee. 2002.** Presynaptic muscarinic M(2)-receptor-mediated inhibition of N-type Ca(2+) channels in cultured sphenopalatine ganglion: direct evidence for acetylcholine inhibition of cerebral nitroergic neurogenic vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 397-405.
- Liu, J., M. S. Evans, G. J. Brewer, and T. J. Lee. 2000c.** N-type Ca²⁺ channels in cultured rat sphenopalatine ganglion neurons: an immunohistochemical and electrophysiological study. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 183-191.
- Liu, X., M. J. Miller, M. S. Joshi, H. Sadowska-Krowicka, D. A. Clark, and J. R. Lancaster, Jr. 1998.** Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 273: 18709-18713.
- Liu, Y. C., A. M. Khawaja, and D. F. Rogers. 1999.** Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP)-related peptides on cholinergic neurogenic and direct mucus secretion in ferret trachea in vitro. *Br J Pharmacol* 128: 1353-1359.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. E. Darnell. 2001.** *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Lundblad, L., J. M. Lundberg, E. Brodin, and A. Anggard. 1983.** Origin and distribution of capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive nerves in the nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 96: 485-493.
- Lutz, E. M., W. J. Sheward, K. M. West, J. A. Morrow, G. Fink, and A. J. Harmar. 1993.** The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* 334: 3-8.
- Marchese, A., S. R. George, L. F. Kolakowski, Jr., K. R. Lynch, and B. F. O'Dowd. 1999.** Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 20: 370-375.
- Marchi, M., M. Lupinacci, E. Bernero, F. Bergaglia, and M. Raiteri. 1999.** Nicotinic receptors modulating ACh release in rat cortical synaptosomes: role of Ca²⁺ ions in their function and desensitization. *Neurochem Int* 34: 319-328.

- Margiotta, J. F., and D. Pardi. 1995.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptors mediate cyclic AMP-dependent enhancement of neuronal acetylcholine sensitivity. *Mol Pharmacol* 48: 63-71.
- Masu, M., Y. Tanabe, K. Tsuchida, R. Shigemoto, and S. Nakanishi. 1991.** Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349: 760-765.
- Matsuda, H., T. Kusakabe, T. Kawakami, T. Takenaka, H. Sawada, and M. Tsukuda. 1996.** Coexistence of nitric oxide synthase and neuropeptides in the mouse vomeronasal organ demonstrated by a combination of double immunofluorescence labeling and a multiple dye filter. *Brain Res* 712: 35-39.
- McCall, R. B. 1988.** Effects of putative neurotransmitters on sympathetic preganglionic neurons. *Annu Rev Physiol* 50: 553-564.
- Meyer, M. R., A. Angele, E. Kremmer, U. B. Kaupp, and F. Muller. 2000.** A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10595-10600.
- Mezler, M., J. Fleischer, and H. Breer. 2001.** Characteristic features and ligand specificity of the two olfactory receptor classes from *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 204: 2987-2997.
- Minami, M., T. Onogi, T. Nakagawa, Y. Katao, Y. Aoki, S. Katsumata, and M. Satoh. 1995.** DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu- and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. *FEBS Lett* 364: 23-27.
- Miyata, A., A. Arimura, R. R. Dahl, N. Minamino, A. Uehara, L. Jiang, M. D. Culler, and D. H. Coy. 1989.** Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 567-574.
- Miyata, A., L. Jiang, R. D. Dahl, C. Kitada, K. Kubo, M. Fujino, N. Minamino, and A. Arimura. 1990.** Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 170: 643-648.
- Moller, M., and W. Liu. 1999.** Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia. A retrograde in vivo neuronal tracing study. *Reprod Nutr Dev* 39: 345-353.
- Mombaerts, P. 1999.** Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 22: 487-509.
- Mombaerts, P. 2001.** The human repertoire of odorant receptor genes and pseudogenes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 493-510.
- Mombaerts, P., F. Wang, C. Dulac, S. K. Chao, A. Nemes, M. Mendelsohn, J. Edmondson, and R. Axel. 1996.** Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87: 675-686.

- Moon, C., P. Jaber, A. Otto-Bruc, W. Baehr, K. Palczewski, and G. V. Ronnett. 1998.** Calcium-sensitive particulate guanylyl cyclase as a modulator of cAMP in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 18: 3195-3205.
- Morales, M. A., K. Holmberg, Z. Q. Xu, C. Cozzari, B. K. Hartman, P. Emson, M. Goldstein, L. G. Elfvén, and T. Hokfelt. 1995.** Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11819-11823.
- Moreton, R. B. 1994.** Optical methods for imaging ionic activities. *Scanning Microsc Suppl* 8: 371-390.
- Morgan, S. J., and D. C. Darling. 1994.** Kultur tierischer Zellen. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Moriyoshi, K., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno, and S. Nakanishi. 1991.** Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37.
- Morris, R., E. Southam, S. R. Gittins, and J. Garthwaite. 1993.** NADPH-diaphorase staining in autonomic and somatic cranial ganglia of the rat. *Neuroreport* 4: 62-64.
- Motosugi, H., T. Chiba, A. Konno, and T. Kaneko. 1992.** Distribution of neuropeptides in rat pterygopalatine ganglion: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Arch Histol Cytol* 55: 513-524.
- Mulle, C., D. Choquet, H. Korn, and J. P. Changeux. 1992.** Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* 8: 135-143.
- Mungan, Z., A. Arimura, A. Ertan, W. J. Rossowski, and D. H. Coy. 1992.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide relaxes rat gastrointestinal smooth muscle. *Scand J Gastroenterol* 27: 375-380.
- Murad, F. 1999.** Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res* 32: 1317-1327.
- Nef, P., I. Hermans-Borgmeyer, H. Artieres-Pin, L. Beasley, V. E. Dionne, and S. F. Heinemann. 1992.** Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8948-8952.
- Nef, S., and P. Nef. 1997.** Olfaction: transient expression of a putative odorant receptor in the avian notochord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4766-4771.
- Ngai, J., M. M. Dowling, L. Buck, R. Axel, and A. Chess. 1993.** The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* 72: 657-666.
- Nickel, R., A. Schummer, and E. Seiferle. 1992.** Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. In E. Seiferle [ed.], *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, 3. Auflage ed. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

- Nielsen, H. S., J. Hannibal, and J. Fahrenkrug. 1998.** Embryonic expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in sensory and autonomic ganglia and in spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 394: 403-415.
- Nordheim, A., and R. Lammers. 2003.** Zelluläre Signalprozesse, pp. 421-450. *In* Unsicker [ed.], *Lehrbuch Vorklinik*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Nozaki, K., M. A. Moskowitz, K. I. Maynard, N. Koketsu, T. M. Dawson, D. S. Bredt, and S. H. Snyder. 1993.** Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 70-79.
- Ohkuma, S., M. Katsura, Y. Hibino, J. Xu, K. Shirotani, and K. Kuriyama. 1998.** Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca²⁺ channels in mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 54: 133-140.
- Okada, M., Y. Osumi, Y. Okuma, and H. Ueno. 2001.** Nitric oxide inhibits the release of acetylcholine in the isolated retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 217-221.
- Okamura, T., K. Ayajiki, H. Fujioka, K. Shinozaki, and N. Toda. 2002.** Neurogenic cerebral vasodilation mediated by nitric oxide. *Jpn J Pharmacol* 88: 32-38.
- Olivera, B. M., L. J. Cruz, V. de Santos, G. W. LeCheminant, D. Griffin, R. Zeikus, J. M. McIntosh, R. Galyean, J. Varga, W. R. Gray, and et al. 1987.** Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry* 26: 2086-2090.
- Owman, C., L. Edvinsson, and K. C. Nielsen. 1974.** Autonomic neuroreceptor mechanisms in brain vessels. *Blood Vessels* 11: 2-31.
- Pantaloni, C., P. Brabet, B. Bilanges, A. Dumuis, S. Houssami, D. Spengler, J. Bockaert, and L. Journot. 1996.** Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem* 271: 22146-22151.
- Pardi, D., and J. F. Margiotta. 1999.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activates a phospholipase C-dependent signal pathway in chick ciliary ganglion neurons that selectively inhibits alpha7-containing nicotinic receptors. *J Neurosci* 19: 6327-6337.
- Parsons, S. M., C. Prior, and I. G. Marshall. 1993.** Acetylcholine transport, storage, and release. *Int Rev Neurobiol* 35: 279-390.
- Paupardin-Tritsch, D., C. Hammond, and H. M. Gerschenfeld. 1986.** Serotonin and cyclic GMP both induce an increase of the calcium current in the same identified molluscan neurons. *J Neurosci* 6: 2715-2723.

- Penzlin, H. 1996.** Geruchssinn, pp. 502-506. *In* H. Penzlin [ed.], Lehrbuch der Tierphysiologie, 6. ed. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Ragozzino, D., B. Barabino, S. Fucile, and F. Eusebi. 1998.** Ca²⁺ permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells. *J Physiol* 507 (Pt 3): 749-757.
- Raming, K., S. Konzelmann, and H. Breer. 1998.** Identification of a novel G-protein coupled receptor expressed in distinct brain regions and a defined olfactory zone. *Receptors Channels* 6: 141-151.
- Randall, D., W. Burggren, and K. French. 2002.** The chemical senses: Taste and smell, pp. 230-237. *In* K. French [ed.], Eckert Animal Physiology - Mechanisms and adaption, 5. ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Rathouz, M. M., S. Vijayaraghavan, and D. K. Berg. 1996.** Elevation of intracellular calcium levels in neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Neurobiol* 12: 117-131.
- Re, L. 1999.** Modulation of acetylcholine release by presynaptic muscarinic autoreceptors. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 49: 215-223.
- Redkozubov, A. 2000.** Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate reduces the response of the Moth's olfactory receptor neuron to pheromone. *Chem Senses* 25: 381-385.
- Reed, R. R. 1990.** How does the nose know? *Cell* 60: 1-2.
- Reuss, B. 2003.** Entwicklung und Anatomie des Nervensystems - Eine Übersicht, pp. 59-104. *In* Unsicker [ed.], Lehrbuch Vorklinik. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Rios, C. D., B. A. Jordan, I. Gomes, and L. A. Devi. 2001.** G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 92: 71-87.
- Roberto, M., and M. Brunelli. 2000.** PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region. *Learn Mem* 7: 303-311.
- Rodriguez, I., P. Feinstein, and P. Mombaerts. 1999.** Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97: 199-208.
- Roe, M. W., J. J. Lemasters, and B. Herman. 1990.** Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* 11: 63-73.
- Rogers, M., L. M. Colquhoun, J. W. Patrick, and J. A. Dani. 1997.** Calcium flux through predominantly independent purinergic ATP and nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurophysiol* 77: 1407-1417.
- Roghani, A., J. Feldman, S. A. Kohan, A. Shirzadi, C. B. Gundersen, N. Brecha, and R. H. Edwards. 1994.** Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10620-10624.

- Ross, W. N. 1989.** Changes in intracellular calcium during neuron activity. *Annu Rev Physiol* 51: 491-506.
- Rossler, W., R. Gerstberger, H. Sann, and F. K. Pierau. 1993.** Distribution and binding sites of substance P and calcitonin gene-related peptide and their capsaicin-sensitivity in the spinal cord of rats and chicken: a comparative study. *Neuropeptides* 25: 241-253.
- Rouse, S. T., S. M. Edmunds, H. Yi, M. L. Gilmor, and A. I. Levey. 2000.** Localization of M(2) muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 284: 182-186.
- Runer, T., A. Cervin, S. Lindberg, and R. Uddman. 1998.** Nitric oxide is a regulator of mucociliary activity in the upper respiratory tract. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 278-287.
- Saito, Y., H. P. Nothacker, Z. Wang, S. H. Lin, F. Leslie, and O. Civelli. 1999.** Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 400: 265-269.
- Sanger, G. J., E. S. Ellis, M. H. Harries, N. S. Tilford, K. A. Wardle, and C. D. Benham. 2000.** Rank-order inhibition by omega-conotoxins in human and animal autonomic nerve preparations. *Eur J Pharmacol* 388: 89-95.
- Sann, H., P. W. McCarthy, M. Mader, and M. Schemann. 1995a.** Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in small diameter neurones of the rat dorsal root ganglion. *Neurosci Lett* 198: 17-20.
- Sann, H., P. W. McCarthy, M. Schemann, M. Jurzak, R. Poethke, and F. K. Pierau. 1995b.** Choline acetyltransferase-immunoreactive neurones in a prevertebral sympathetic ganglion, the inferior mesenteric ganglion. *J Auton Nerv Syst* 54: 195-205.
- Sato, M., and M. Kawatani. 1996.** Nitric oxide raises cytosolic concentrations of Ca^{2+} in cultured nodose ganglion neurons from rabbits. *Neurosci Lett* 206: 69-72.
- Schafer, M. K., E. Weihe, H. Varoqui, L. E. Eiden, and J. D. Erickson. 1994.** Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J Mol Neurosci* 5: 1-26.
- Schemann, M., C. Schaaf, and M. Mader. 1995.** Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J Comp Neurol* 353: 161-178.
- Schemann, M., H. Sann, C. Schaaf, and M. Mader. 1993.** Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am J Physiol* 265: G1005-1009.
- Schmachtenberg, O., J. Diaz, and J. Bacigalupo. 2003.** NO activates the olfactory cyclic nucleotide-gated conductance independent from cGMP in isolated rat olfactory receptor neurons. *Brain Res* 980: 146-150.

- Schmidt, R., and M. Zimmermann. 1987.** Grundriß der Neurophysiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Schmidt, R. F., and G. Thews. 2000.** Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin.
- Seebeck, J., W. E. Schmidt, H. Kilbinger, J. Neumann, N. Zimmermann, and S. Herzig. 1996.** PACAP induces bradycardia in guinea-pig heart by stimulation of atrial cholinergic neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354: 424-430.
- Senba, E., T. Kaneko, N. Mizuno, and M. Tohyama. 1991.** Somato-, branchio- and visceromotor neurons contain glutaminase-like immunoreactivity. *Brain Res Bull* 26: 85-97.
- Seylaz, J., H. Hara, E. Pinard, S. Mraovitch, E. T. MacKenzie, and L. Edvinsson. 1988.** Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 875-878.
- Sharples, C., and S. Wonnacott. 2001.** Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews* No. 19.
- Sheng, H., G. D. Gagne, T. Matsumoto, M. F. Miller, U. Forstermann, and F. Murad. 1993.** Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. *J Neurochem* 61: 1120-1126.
- Shigyo, M., H. Aizawa, H. Inoue, K. Matsumoto, S. Takata, and N. Hara. 1998.** Pituitary adenylate cyclase activating peptide regulates neurally mediated airway responses. *Eur Respir J* 12: 64-70.
- Shimizu, T., J. L. Morris, and I. L. Gibbins. 2001.** Expression of immunoreactivity to neurokinin-1 receptor by subsets of cranial parasympathetic neurons: correlation with neuropeptides, nitric oxide synthase, and pathways. *Exp Neurol* 172: 293-306.
- Shimizu, T., A. Koto, N. Suzuki, Y. Morita, M. Takao, S. Otomo, and Y. Fukuuchi. 1999.** Occurrence and distribution of substance P receptors in the cerebral blood vessels of the rat. *Brain Res* 830: 372-378.
- Si, M. L., and T. J. Lee. 2001.** Presynaptic $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors mediate nicotine-induced nitric oxidergic neurogenic vasodilation in porcine basilar arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 122-128.
- Simon, J., and E. A. Barnard. 2003.** The P2Y nucleotide receptors in the human genome. *Acta Biol Hung* 54: 191-201.
- Skok, V. I. 2002.** Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. *Auton Neurosci* 97: 1-11.
- Skoogh, B. E. 1986.** Parasympathetic ganglia in the airways. *Bull Eur Physiopathol Respir* 22 Suppl 7: 143-147.

- Skoogh, B. E., and N. Svedmyr. 1989.** Beta 2-adrenoceptor stimulation inhibits ganglionic transmission in ferret trachea. *Pulm Pharmacol* 1: 167-172.
- Snyder, S. H. 1992.** Nitric oxide and neurons. *Curr Opin Neurobiol* 2: 323-327.
- Soinila, S., S. Vanhatalo, A. Lumme, N. Back, and J. Soinila. 1996.** Nitric oxide synthase in the autonomic and sensory ganglia innervating the submandibular salivary gland. *Microsc Res Tech* 35: 32-43.
- Southam, E., and J. Garthwaite. 1993.** The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* 32: 1267-1277.
- Spengler, D., C. Waeber, C. Pantaloni, F. Holsboer, J. Bockaert, P. H. Seeburg, and L. Journot. 1993.** Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365: 170-175.
- Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood, and R. A. Dixon. 1994.** Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63: 101-132.
- Strata, P., and R. Harvey. 1999.** Dale's principle. *Brain Res Bull* 50: 349-350.
- Strotmann, J., I. Wanner, T. Helfrich, and H. Breer. 1995.** Receptor expression in olfactory neurons during rat development: in situ hybridization studies. *Eur J Neurosci* 7: 492-500.
- Sullivan, J. C., A. D. Giulian, D. M. Pollock, L. C. Fuchs, and J. S. Pollock. 2002.** Functional NOS 1 in the rat mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H658-663.
- Suzuki, N., and J. E. Hardebo. 1993.** The cerebrovascular parasympathetic innervation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5: 33-46.
- Suzuki, N., J. E. Hardebo, and C. Owman. 1988.** Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-positive nerves in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 697-712.
- Suzuki, N., J. E. Hardebo, and C. Owman. 1989.** Trigeminal fibre collaterals storing substance P and calcitonin gene-related peptide associate with ganglion cells containing choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide in the sphenopalatine ganglion of the rat. An axon reflex modulating parasympathetic ganglionic activity? *Neuroscience* 30: 595-604.
- Suzuki, N., J. E. Hardebo, and C. Owman. 1990a.** Origins and pathways of choline acetyltransferase-positive parasympathetic nerve fibers to cerebral vessels in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 399-408.
- Suzuki, N., J. E. Hardebo, G. Skagerberg, and C. Owman. 1990b.** Central origins of preganglionic fibers to the sphenopalatine ganglion in the rat. A fluorescent retrograde tracer study with special reference to its relation to central catecholaminergic systems. *J Auton Nerv Syst* 30: 101-109.

- Suzuki, N., J. E. Hardebo, J. Kahrstrom, and C. Owman. 1990c.** Neuropeptide Y co-exists with vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine in parasympathetic cerebrovascular nerves originating in the sphenopalatine, otic, and internal carotid ganglia of the rat. *Neuroscience* 36: 507-519.
- Takeuch, T., K. Sugimoto, H. Morimoto, A. Fujita, and F. Hata. 2001.** Mechanism of a nitric oxide donor NOR 1-induced relaxation in longitudinal muscle of rat proximal colon. *Jpn J Pharmacol* 86: 390-398.
- Tansey, E. M. 1991.** Chemical neurotransmission in the autonomic nervous system: Sir Henry Dale and acetylcholine. *Clin Auton Res* 1: 63-72.
- Thomas, A. R., and F. Delaville. 1991.** The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells, pp. 1-54. *In* P. H. Cobbold [ed.], *Cellular Calcium, A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Thomas, D. D., X. Liu, S. P. Kantrow, and J. R. Lancaster, Jr. 2001.** The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 355-360.
- Thompson, R. J., J. F. Doran, P. Jackson, A. P. Dhillon, and J. Rode. 1983.** PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 278: 224-228.
- Toda, M., T. Okamura, I. Azuma, and N. Toda. 1997.** Modulation by neurogenic acetylcholine of nitroxidergic nerve function in porcine ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2261-2269.
- Toda, N., and T. Okamura. 1996.** Neurogenic nitric oxide (NO) in the regulation of cerebroarterial tone. *J Chem Neuroanat* 10: 259-265.
- Toda, N., K. Ayajiki, T. Tanaka, and T. Okamura. 2000a.** Preganglionic and postganglionic neurons responsible for cerebral vasodilation mediated by nitric oxide in anesthetized dogs. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 700-708.
- Toda, N., T. Tanaka, K. Ayajiki, and T. Okamura. 2000b.** Cerebral vasodilatation induced by stimulation of the pterygopalatine ganglion and greater petrosal nerve in anesthetized monkeys. *Neuroscience* 96: 393-398.
- Toda, N., K. Ayajiki, K. Yoshida, H. Kimura, and T. Okamura. 1993.** Impairment by damage of the pterygopalatine ganglion of nitroxidergic vasodilator nerve function in canine cerebral and retinal arteries. *Circ Res* 72: 206-213.
- Tohyama, M., and K. Takatsuji. 1998.** *Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Touhara, K. 2002.** Odor discrimination by G protein-coupled olfactory receptors. *Microsc Res Tech* 58: 135-141.

- Tsien, R. Y. 1980.** New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19: 2396-2404.
- Tsien, R. Y. 1989.** Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci* 12: 227-253.
- Tsien, R. Y. 1998.** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.
- Tsien, R. Y., and M. Poenie. 1986.** Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *TIBS* 11: 450-455.
- Tsien, R. Y., T. J. Rink, and M. Poenie. 1985.** Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6: 145-157.
- Uddman, R., T. Grunditz, J. Kato, and F. Sundler. 1998.** Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat Embryol (Berl)* 197: 273-282.
- Uddman, R., J. Tajti, S. Moller, F. Sundler, and L. Edvinsson. 1999.** Neuronal messengers and peptide receptors in the human sphenopalatine and otic ganglia. *Brain Res* 826: 193-199.
- Ueki, Y., H. Nakamura, K. Matsumoto, T. Tominaga, S. Miyake, Y. Kita, Y. Katayama, S. Fukuyama, Y. Hirasawa, K. Yoshida, and K. Eguchi. 2002.** NOR-1: a nitric oxide releasing agent for calibrating low levels of nitric oxide by the chemiluminescence method. *Blood Coagul Fibrinolysis* 13: 75-80.
- Usdin, T. B., L. E. Eiden, T. I. Bonner, and J. D. Erickson. 1995.** Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci* 18: 218-224.
- Vanti, W. B., T. Nguyen, R. Cheng, K. R. Lynch, S. R. George, and B. F. O'Dowd. 2003.** Novel human G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 67-71.
- Varoqui, H., and J. D. Erickson. 1996.** Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *J Biol Chem* 271: 27229-27232.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann, and G. A. Gaitanaris. 2003.** The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4903-4908.
- Vega, T., R. De Pascual, O. Bulbena, and A. G. Garcia. 1995.** Effects of omega-toxins on noradrenergic neurotransmission in beating guinea pig atria. *Eur J Pharmacol* 276: 231-238.
- Vinores, S. A., M. M. Herman, L. J. Rubinstein, and P. J. Marangos. 1984.** Electron microscopic localization of neuron-specific enolase in rat and mouse brain. *J Histochem Cytochem* 32: 1295-1302.

- Wang, F., A. Nemes, M. Mendelsohn, and R. Axel. 1998.** Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93: 47-60.
- Weber, M., U. Pehl, H. Breer, and J. Strotmann. 2002.** Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *J Neurosci Res* 68: 176-184.
- Weihe, E., J. H. Tao-Cheng, M. K. Schafer, J. D. Erickson, and L. E. Eiden. 1996.** Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3547-3552.
- Wenisch, S., C. Andressen, A. Derouiche, S. Arnhold, K. Addicks, and R. Leiser. 2000.** Heme oxygenase-2 and nitric oxide synthase immunoreactivity of bovine olfactory receptor neurons and a comparison with the distribution of NADPH-diaphorase staining. *Histochem J* 32: 381-388.
- Wiesner, E., and R. Ribbeck. 1991.** Wörterbuch der Veterinärmedizin. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Wimmer, E., and A. Nomoto. 1993.** Molecular biology and cell-free synthesis of poliovirus. *Biologicals* 21: 349-356.
- Wise, A., S. C. Jupe, and S. Rees. 2004.** The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 43-66.
- Wittke, G. 1987.** Geruchssinn, pp. 595-605. *In* A. Trautmann [ed.], *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*, 7. ed. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Wonnacott, S. 1997.** Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92-98.
- Xu, Z. J., and D. J. Adams. 1993.** Alpha-adrenergic modulation of ionic currents in cultured parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J Neurophysiol* 69: 1060-1070.
- Yamamoto, R., D. S. Bredt, S. H. Snyder, and R. A. Stone. 1993.** The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54: 189-200.
- Yu, C. R., and L. W. Role. 1998.** Functional contribution of the $\alpha 5$ subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones. *J Physiol* 509 (Pt 3): 667-681.
- Yu, J. G., T. Kimura, X. F. Chang, and T. J. Lee. 1998.** Segregation of VIPergic-nitric oxidergic and cholinergic-nitric oxidergic innervation in porcine middle cerebral arteries. *Brain Res* 801: 78-87.
- Yu, J. G., T. Ishine, T. Kimura, W. E. O'Brien, and T. J. Lee. 1997.** L-citrulline conversion to L-arginine in sphenopalatine ganglia and cerebral perivascular nerves in the pig. *Am J Physiol* 273: H2192-2199.

- Yu, M., C. W. Sun, K. G. Maier, D. R. Harder, and R. J. Roman. 2002.** Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1724-1731.
- Zhu, B. S., I. L. Gibbins, and W. W. Blessing. 1997.** Preganglionic parasympathetic neurons projecting to the sphenopalatine ganglion contain nitric oxide synthase in the rabbit. *Brain Res* 769: 168-172.
- Zufall, F., and T. Leinders-Zufall. 1998.** Role of cyclic GMP in olfactory transduction and adaptation. *Ann N Y Acad Sci* 855: 199-204.
- Zufall, F., and S. D. Munger. 2001.** From odor and pheromone transduction to the organization of the sense of smell. *Trends Neurosci* 24: 191-193.
- Zufall, F., S. Firestein, and G. M. Shepherd. 1991.** Analysis of single cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor cells. *J Neurosci* 11: 3573-3580.
- Zufall, F., S. Firestein, and G. M. Shepherd. 1994.** Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 577-607.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Die Signalkaskade G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR).....	15
Abbildung 2 : Verwandtschaftsdiagramm des MOL2.3-Rezeptors.....	17
Abbildung 3 : MOL2.3-positive Signale in der <i>Area postrema</i> des Hirnstamms und im olfaktorischen Epithel.	18
Abbildung 4 : Nachweis der Expression des MOL2.3-Rezeptorproteins in cranialen Ganglien mittels <i>in situ</i> Hybridisierung (Weber et al. 2002).	18
Abbildung 5 : Innervationsgebiete MOL2.3-positiver Zellen.....	19
Abbildung 6 : Wildtyp Locus des MOL2.3 Gens sowie die MOL2.3-IGITL Mutation nach homologer Rekombination.....	22
Abbildung 7 : Schematische Darstellung der Lage des <i>Ganglion sphenopalatinum</i>	24
Abbildung 8 : Schematische Darstellung der prä- und postganglionären Fasern des <i>Ganglion sphenopalatinum</i>	27
Abbildung 9 : Der zelluläre Calciumstoffwechsel.....	36
Abbildung 10 : Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls.	49
Abbildung 11 : Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz.	50
Abbildung 12 : Exzitationsspektren von Fura-2.	65
Abbildung 13 : Strukturformel des Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM).....	67
Abbildung 14 : Schematische Darstellung des Imaging-Messstandes.....	69
Abbildung 15 : Strukturformel von Acetylcholin.....	72
Abbildung 16 : Strukturformel von Bethanechol.....	74
Abbildung 17 : Strukturformel von DMPP.....	74
Abbildung 18 : Strukturformel von MLA.....	75
Abbildung 19 : Strukturformel von Nifedipin	76
Abbildung 20: Strukturformel von DEA	77
Abbildung 21: Strukturformel von Nor-1	78
Abbildung 22 : Strukturformel von Vinyl-L-NIO	78
Abbildung 23 : Strukturformel von Noradrenalin.....	80
Abbildung 24 : Strukturformel von Glutamat.....	80
Abbildung 25 : Nachweis der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper an der Ratte.....	84
Abbildung 26 : Nachweis der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper an der MOL2.3 –IGITL Maus.....	85
Abbildung 27: Immunfluoreszenzhistochemische Abbildung des <i>Ganglion sphenopalatinum</i>	87

Abbildung 28 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE) sowie deren Co-Lokalisation.	88
Abbildung 29 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) sowie deren Co-Lokalisation.	89
Abbildung 30 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, des vesikulären Acetylcholin Transporters (VACHT) sowie deren Co-Lokalisation.	90
Abbildung 31 : Immunhistochemische Lokalisation des GFP-gekoppelten MOL2.3-Rezeptorproteins, der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) sowie deren Co-Lokalisation.	92
Abbildung 32 : Immunhistochemische Lokalisation von VACHT und nNOS, sowie deren Co-Lokalisation.	93
Abbildung 33 : Immunhistochemischer Nachweis von GFP und PACAP im SPG. .	94
Abbildung 34 : Immunhistochemischer Nachweis von GFP und SP.	94
Abbildung 35 : Fluoreszenzmikroskopisches Bild MOL2.3-positiver Zellen (EGFP; ARW 488 nm, EWL 510 nm).....	96
Abbildung 36 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem K ⁺	97
Abbildung 37 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit K ⁺	98
Abbildung 38 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit extrazellulärem Acetylcholin.	99
Abbildung 39 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit extrazellulärem Acetylcholin.	100
Abbildung 40 : 340/380 nm Ratio Signal einzelner MOL2.3-positiver Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin (10 ⁻⁴ M/l) über die Pumpe (A) bzw. als Bolus (B).....	101
Abbildung 41 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit extrazellulärem Acetylcholin steigender Konzentration.	102
Abbildung 42 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit extrazellulärem Acetylcholin steigender Konzentration.	104
Abbildung 43 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin steigender Konzentration (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ und 10 ⁻⁴ M/l).	105
Abbildung 44 : Repetitive Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit extrazellulärem Acetylcholin.	106

Abbildung 45 : Repetitive Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit extrazellulärem Acetylcholin.	107
Abbildung 46 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach repetitiver Stimulation mit Acetylcholin einer konstanten Konzentration von 10^{-4} M/l.	108
Abbildung 47 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin bei An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium.	109
Abbildung 48 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin bei An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium.	110
Abbildung 49 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin bei An- und Abwesenheit extrazellulären Calciums.	111
Abbildung 50 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin, DMPP und Bethanechol.	113
Abbildung 51 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin, DMPP und Bethanechol.	114
Abbildung 52 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin und cholinergen Agonisten.	115
Abbildung 53 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und MLA.	117
Abbildung 54 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und MLA.	118
Abbildung 55 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin und MLA.	119
Abbildung 56 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIC.	121
Abbildung 57 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIC.	122
Abbildung 58 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIC.	123
Abbildung 59 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIA.	125
Abbildung 60 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und ω -Conotoxin MVIIA.	126

Abbildung 61 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin, ACh nach Inkubation mit ω -Conotoxin MVIIA und einem ACh-Kontrollstimulus.	127
Abbildung 62 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und Nifedipin.	128
Abbildung 63 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und Nifedipin.	130
Abbildung 64 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin, Nifedipin, ACh nach Inkubation mit Nifedipin und einem ACh-Kontrollstimulus.	131
Abbildung 65 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem DEA.	132
Abbildung 66 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit dem NO-Donor DEA. .	133
Abbildung 67 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und DEA.	135
Abbildung 68 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und DEA.	136
Abbildung 69 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin, DEA, ACh co-appliziert mit DEA und einem ACh-Kontrollstimulus.	137
Abbildung 70 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem Nor-1.	138
Abbildung 71 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Nor-1.	139
Abbildung 72 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und Nor-1.	140
Abbildung 73 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und Nor-1.	141
Abbildung 74 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin, Nor-1, ACh co-appliziert mit Nor-1 und einem ACh-Kontrollstimulus.	142
Abbildung 75 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und Vinyl-L-NIO.	144
Abbildung 76 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und Vinyl-L-NIO.	145
Abbildung 77 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin, dem nNOS-Blocker Vinyl-L-NIO, ACh nach Inkubation mit Vinyl-L-NIO und einem ACh-Kontrollstimulus.	146

Abbildung 78 : Stimulation MOL2.3-positiver und -negativer Zellen mit extrazellulärem PACAP.	147
Abbildung 79 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit PACAP.....	148
Abbildung 80 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit Acetylcholin und PACAP.	149
Abbildung 81 : Stimulation MOL2.3-negativer Zellen mit Acetylcholin und PACAP.	150
Abbildung 82 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Acetylcholin, PACAP, ACh co-appliziert mit PACAP und einem ACh-Kontrollstimulus.	151
Abbildung 83 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit extrazellulärem Noradrenalin.	152
Abbildung 84 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Noradrenalin.....	153
Abbildung 85 : Stimulation MOL2.3-positiver Zellen mit extrazellulärem Glutamat.	154
Abbildung 86 : 340/380 nm Ratio Signal einer einzelnen MOL2.3-positiven Zelle des <i>Ganglion sphenopalatinum</i> nach Stimulation mit Glutamat.....	155
Abbildung 87: Das cholinerge System im <i>Ganglion sphenopalatinum</i>	161
Abbildung 88: Der Einfluss von Acetylcholin auf die NO-Synthese	165
Abbildung 89: Modulation nicotinerger AChR durch NO in MOL2.3-positiven Zellen.....	167
Abbildung 90: Hemmung der cholinergen Signaltransduktion in MOL2.3-positiven Zellen.....	169
Abbildung 91: Mögliche intrazelluläre Aktionen von PACAP	171

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die Überlassung des Themas bedanken und dafür, dass er fast die gesamte Betreuung des Projektes übernommen hat. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und vor allem seine Geduld haben sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Daniela Hild, die mir die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden sehr erleichtert hat, und auch ansonsten jederzeit zur Stelle war.

Herrn Dr. Ulrich Pehl danke ich dafür, dass er das Projekt in Gießen initiiert hat, und dass er mir die Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten gegeben hat.

Den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie, insbesondere der AG Gerstberger, möchte ich für das gute Arbeitsklima danken. Besonders Eva-Maria Harré und Thilo Voss gilt an dieser Stelle ein Dankeschön.

Herrn Michael Haas danke ich ganz herzlich für die gewissenhafte Pflege und Betreuung der Versuchstiere, Herrn Herman Maurer für die Hilfe bei technischen Problemen.

Herrn Dr. Jörg Strotmann sei dafür gedankt, dass er die transgene Mauslinie zur Verfügung gestellt hat, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger und Frau Jana Heber möchte ich für die Organisation aller Belange des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“ danken. Auch den anderen Doktoranden des Kollegs sei gedankt für die angenehme Atmosphäre.

Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Freund Sascha Rafalzik, der mich während der Zeit meiner Doktorarbeit in allen Situationen unterstützt hat.

Außerdem danke ich natürlich meiner Familie, die mich sowohl während meines Studiums als auch während der Promotion immer unterstützt hat.

... last not least sei selbstverständlich Tasso gedankt, der in dieser Zeit immer für die nötige Ablenkung gesorgt hat (ob er wollte oder nicht!).

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.